

**UNTERSUCHUNGEN ZUR AKROSOMALEN REAKTION  
UND MOTILITÄT AN MENSCHLICHEN  
SPERMATOZOEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG VERSCHIEDENER  
ANDROLOGISCHER KRANKHEITSBILDER**

**ERNST HESSLER**

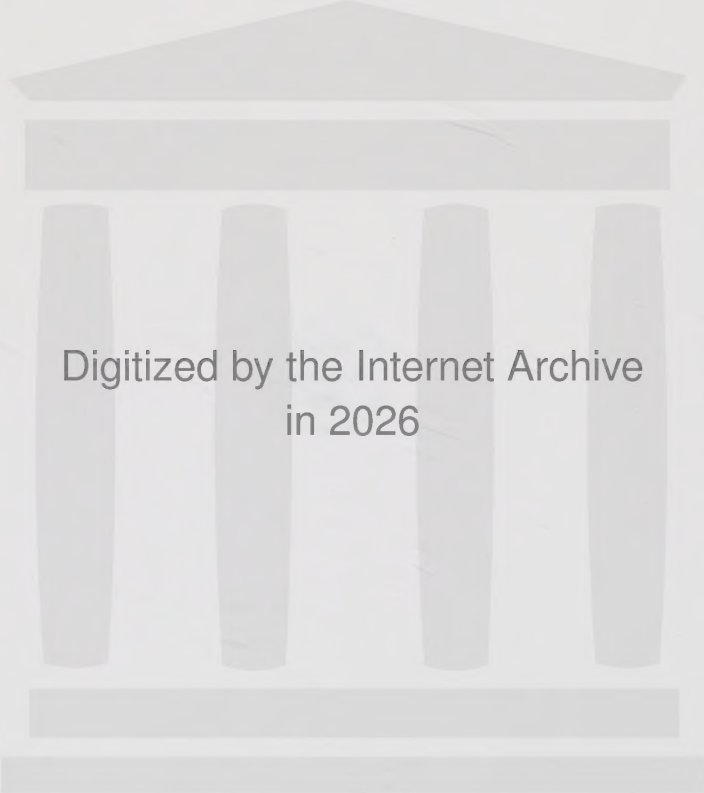
**1987**

Disbui. München

1987







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554624\\_0030](https://archive.org/details/IA41554624_0030)

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der  
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

UNTERSUCHUNGEN ZUR AKROSOMALEN REAKTION UND MOTILITÄT AN  
MENSCHLICHEN SPERMATOZOEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG  
VERSCHIEDENER ANDROLOGISCHER KRANKHEITSBILDER

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Ernst Heißler  
aus  
Nürnberg

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W.-B. Schill

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco  
2. Prof. Dr. med. R. Tauber

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 12. 1987

# MEINEN ELTERN

|     |              |     |
|-----|--------------|-----|
| 1   | Einleitung   | 1   |
| 2   | Die Eltern   | 2   |
| 3   | Die Kindheit | 3   |
| 4   | Die Jugend   | 4   |
| 5   | Die Ehe      | 5   |
| 6   | Die Kinder   | 6   |
| 7   | Die Eltern   | 7   |
| 8   | Die Kindheit | 8   |
| 9   | Die Jugend   | 9   |
| 10  | Die Ehe      | 10  |
| 11  | Die Kinder   | 11  |
| 12  | Die Eltern   | 12  |
| 13  | Die Kindheit | 13  |
| 14  | Die Jugend   | 14  |
| 15  | Die Ehe      | 15  |
| 16  | Die Kinder   | 16  |
| 17  | Die Eltern   | 17  |
| 18  | Die Kindheit | 18  |
| 19  | Die Jugend   | 19  |
| 20  | Die Ehe      | 20  |
| 21  | Die Kinder   | 21  |
| 22  | Die Eltern   | 22  |
| 23  | Die Kindheit | 23  |
| 24  | Die Jugend   | 24  |
| 25  | Die Ehe      | 25  |
| 26  | Die Kinder   | 26  |
| 27  | Die Eltern   | 27  |
| 28  | Die Kindheit | 28  |
| 29  | Die Jugend   | 29  |
| 30  | Die Ehe      | 30  |
| 31  | Die Kinder   | 31  |
| 32  | Die Eltern   | 32  |
| 33  | Die Kindheit | 33  |
| 34  | Die Jugend   | 34  |
| 35  | Die Ehe      | 35  |
| 36  | Die Kinder   | 36  |
| 37  | Die Eltern   | 37  |
| 38  | Die Kindheit | 38  |
| 39  | Die Jugend   | 39  |
| 40  | Die Ehe      | 40  |
| 41  | Die Kinder   | 41  |
| 42  | Die Eltern   | 42  |
| 43  | Die Kindheit | 43  |
| 44  | Die Jugend   | 44  |
| 45  | Die Ehe      | 45  |
| 46  | Die Kinder   | 46  |
| 47  | Die Eltern   | 47  |
| 48  | Die Kindheit | 48  |
| 49  | Die Jugend   | 49  |
| 50  | Die Ehe      | 50  |
| 51  | Die Kinder   | 51  |
| 52  | Die Eltern   | 52  |
| 53  | Die Kindheit | 53  |
| 54  | Die Jugend   | 54  |
| 55  | Die Ehe      | 55  |
| 56  | Die Kinder   | 56  |
| 57  | Die Eltern   | 57  |
| 58  | Die Kindheit | 58  |
| 59  | Die Jugend   | 59  |
| 60  | Die Ehe      | 60  |
| 61  | Die Kinder   | 61  |
| 62  | Die Eltern   | 62  |
| 63  | Die Kindheit | 63  |
| 64  | Die Jugend   | 64  |
| 65  | Die Ehe      | 65  |
| 66  | Die Kinder   | 66  |
| 67  | Die Eltern   | 67  |
| 68  | Die Kindheit | 68  |
| 69  | Die Jugend   | 69  |
| 70  | Die Ehe      | 70  |
| 71  | Die Kinder   | 71  |
| 72  | Die Eltern   | 72  |
| 73  | Die Kindheit | 73  |
| 74  | Die Jugend   | 74  |
| 75  | Die Ehe      | 75  |
| 76  | Die Kinder   | 76  |
| 77  | Die Eltern   | 77  |
| 78  | Die Kindheit | 78  |
| 79  | Die Jugend   | 79  |
| 80  | Die Ehe      | 80  |
| 81  | Die Kinder   | 81  |
| 82  | Die Eltern   | 82  |
| 83  | Die Kindheit | 83  |
| 84  | Die Jugend   | 84  |
| 85  | Die Ehe      | 85  |
| 86  | Die Kinder   | 86  |
| 87  | Die Eltern   | 87  |
| 88  | Die Kindheit | 88  |
| 89  | Die Jugend   | 89  |
| 90  | Die Ehe      | 90  |
| 91  | Die Kinder   | 91  |
| 92  | Die Eltern   | 92  |
| 93  | Die Kindheit | 93  |
| 94  | Die Jugend   | 94  |
| 95  | Die Ehe      | 95  |
| 96  | Die Kinder   | 96  |
| 97  | Die Eltern   | 97  |
| 98  | Die Kindheit | 98  |
| 99  | Die Jugend   | 99  |
| 100 | Die Ehe      | 100 |



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. EINLEITUNG.....                                                                             | 1     |
| 2. THEORETISCHE VORBEMERKUNGEN.....                                                            | 3     |
| 2.1. Morphologie des Spermatozoons.....                                                        | 3     |
| 2.1.1. Strukturen des Kopfes.....                                                              | 3     |
| 2.1.2. Strukturen des Mittelstückes und des Schwanzes...                                       | 5     |
| 2.2. Veränderungen am Akrosom.....                                                             | 7     |
| 2.2.1. Definition der Kapazitation.....                                                        | 8     |
| 2.2.2. Definition der Akrosomreaktion.....                                                     | 8     |
| 2.3. Die Bedeutung des Seminalplasmas für die<br>Kapazitation und Akrosomreaktion.....         | 10    |
| 2.4. Biochemische Vorgänge an der Akrosommembran.....                                          | 11    |
| 2.4.1. Bestandteile der unkapazitierten Membran.....                                           | 11    |
| 2.4.2. Cholesterin und die akrosomalen Membranen.....                                          | 11    |
| 2.4.2.1. Stabilisierende Eigenschaften des Cholesterins<br>als Membranbestandteil.....         | 11    |
| 2.4.2.2. Transportsystem für die Entfernung von<br>Cholesterin aus der Plasmamembran.....      | 13    |
| 2.4.3. Phospholipide als Membranbestandteil.....                                               | 13    |
| 2.5. Modell der Kapazitation und Akrosomreaktion<br>auf molekularer Ebene.....                 | 17    |
| 2.5.1. Die Einwirkung von Sterolsulfatase auf die<br>akrosomalen Membranen.....                | 19    |
| 2.5.2. Reduzierung des Cholesterrinanteils in der<br>Plasmamembran.....                        | 19    |
| 2.5.3. Bedeutung des Phospholipidmetabolismus für<br>die Kapazitation und Akrosomreaktion..... | 22    |
| 2.6. Morphologischer Ablauf der Akrosomreaktion.....                                           | 26    |
| 2.7. Motilität.....                                                                            | 28    |
| 2.7.1. Progressivmotilität.....                                                                | 28    |

|                                                                                                                        | Seite  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.7.2. Hyperaktivierte Bewegung ("whiplash-Bewegung")..                                                                | 29     |
| 2.7.2.1. Beobachtung und Beschreibung der<br>Hyperaktivierung.....                                                     | 29     |
| 2.7.2.2. Hyperaktivierung und Akrosomreaktion.....                                                                     | 31     |
| 2.7.2.3. Vergleich der hyperaktivierten Motilität mit<br>der Progressivmotilität.....                                  | 31     |
| 2.7.2.4. Funktion der hyperaktivierten Motilität.....                                                                  | 32     |
| <br>3. MATERIAL UND METHODEN.....                                                                                      | <br>34 |
| 3.1. Auswahl der Patienten.....                                                                                        | 34     |
| 3.2. Ablauf der Untersuchung.....                                                                                      | 34     |
| 3.3. Sperma-Analyse.....                                                                                               | 35     |
| 3.4. Verwendete Lösungen und Farbstoffe.....                                                                           | 36     |
| 3.4.1. Untersuchungen in nicht kapazitierenden Medien..                                                                | 36     |
| 3.4.2. Untersuchungen in kapazitierenden Medien.....                                                                   | 37     |
| 3.5. Beschreibung des Färbevorgangs.....                                                                               | 38     |
| 3.5.1. Färbevorgang bei der ersten Patientengruppe<br>(nicht-kapazitierende Medien).....                               | 38     |
| 3.5.2. Färbevorgang bei der zweiten Patientengruppe<br>und den Polyzoospermiepatienten (kapazitierende<br>Medien)..... | 39     |
| 3.6. Auswertung der gefärbten Ausstrichpräparate....                                                                   | 39     |
| 3.7. Beurteilung der Färbemethode.....                                                                                 | 41     |
| 3.8. Motilitätsmessung mit der Dunkelfeldmethode....                                                                   | 42     |
| 3.8.1. Verwendete Geräte und Materialien.....                                                                          | 42     |
| 3.8.2. Motilitätsmessung.....                                                                                          | 43     |
| 3.8.3 Motilitätsparameter.....                                                                                         | 44     |
| 3.9. Beurteilung der Motilitätsmessmethode.....                                                                        | 44     |
| <br>4. ERGEBNISSE.....                                                                                                 | <br>45 |
| 4.1. Untersuchungen an Spermatozoen in nicht-<br>kapazitierendem Medium.....                                           | 45     |

|            |                                                                                                               |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.1.     | Patientengruppe.....                                                                                          | 45 |
| 4.1.2.     | Ergebnisse der Anfärbung nach dem "triple-stain"-Verfahren.....                                               | 45 |
| 4.2.       | Untersuchungen an Spermatozoen in kapazitierenden Medien.....                                                 | 50 |
| 4.2.1.     | Patientengruppe.....                                                                                          | 50 |
| 4.2.2.     | Ergebnisse der Anfärbung nach dem "triple-stain"-Verfahren-.....                                              | 51 |
| 4.2.2.1.   | Graphische Darstellung der Befunde.....                                                                       | 51 |
| 4.2.2.1.1. | Normozoospermiegruppe.....                                                                                    | 51 |
| 4.2.2.1.2. | Oligozoospermiegruppe.....                                                                                    | 54 |
| 4.2.2.1.3. | Asthenozoospermiegruppe.....                                                                                  | 54 |
| 4.2.2.1.4. | Teratozoospermiegruppe.....                                                                                   | 57 |
| 4.2.2.1.5. | Polyzoospermiegruppe.....                                                                                     | 57 |
| 4.2.2.1.6. | Darstellung der Medianwerte und Interquartilbereiche der einzelnen Diagnosegruppen im Vergleich.....          | 60 |
| 4.2.2.1.7. | Gemeinsame Darstellung der Einzelbefunde.....                                                                 | 60 |
| 4.2.3.     | Ergebnisse der Motilitätsmessung nach der fotomikrographischen Dunkelfeldmethode.....                         | 65 |
| 4.2.3.1.   | Graphische Darstellung der Einzelbefunde.....                                                                 | 65 |
| 4.2.3.2.   | Graphische Darstellung der arithmetischen Mittelwerte und Standartabweichungen.....                           | 66 |
| 5.         | DISKUSSION.....                                                                                               | 87 |
| 5.1.       | Allgemeines.....                                                                                              | 87 |
| 5.2.       | Diskussion der Färbemethode.....                                                                              | 88 |
| 5.3.       | Diskussion der Ergebnisse der Versuche in nicht kapazitierenden Medien.....                                   | 89 |
| 5.4.       | Diskussion der Ergebnisse von Untersuchungen zur Kinetik der Akrosomreaktion (in kapazitierenden Medien)..... | 90 |
| 5.4.1.     | Diskussion der Ergebnisse der Polyzoospermiegruppe.....                                                       | 92 |

|        |                                                                                      |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.4.2. | Diskussion der Ergebnisse der Normo-, Oligo-,<br>Astheno- und Teratozoospermien..... | 94  |
| 5.4.3. | Wo sind die Grenzen für den normalen Ablauf der<br>Akrosomreaktion ?.....            | 96  |
| 5.4.4. | Diskussion einzelner Kurvenverläufe.....                                             | 99  |
| 5.5.   | Diskussion der Motilitätsparameter.....                                              | 101 |
| 6.     | ZUSAMMENFASSUNG.....                                                                 | 103 |
| 7.     | LITERATURVERZEICHNIS.....                                                            | 105 |
| 8.     | DANKSAGUNG.....                                                                      | 127 |
| 9.     | LEBENS LAUF.....°.....                                                               | 128 |

Die Fertilität gehört zu den Themen, mit welchen sich die Menschheit seit urdenklichen Zeiten beschäftigt. Eine Fülle von Volksbräuchen, die sich um die menschliche Fortpflanzungsfähigkeit ranken sind bekannt. Einige davon sind auch heute noch gebräuchlich, so wird z.B. in einigen Ländern bis in die heutige Zeit das Brautpaar mit Reis beworfen. Auch der Brauch das Johannisfeuer zu überspringen steht in diesem Zusammenhang. Das sind aber nur bescheidene Reste dessen, was im Mittelalter üblich war. Aus dieser Zeit wird beispielsweise berichtet, daß in Uppsala Fricco-Freyr, der Gott der Fruchtbarkeit, throne "cum ingenti priapo"; auch für Deutschland sind ähnliche Darstellungen bezeugt, von denen sich unfruchtbare Frauen Hilfe erflehten. An manchen Orten wurde vom Phallus dieser Figuren etwas abgeschabt und mit Wasser vermischt eingenommen.

Neben diesen noch recht harmlosen Mitteln, griff man auch zu drastischeren Maßnahmen. So wurden die getrockneten Genitalien eines Hasen in Ziegenmilch oder Branntwein gelöst oder auch das Blut einer Erstgebärenden mit Branntwein vermischt und eingenommen.

Recht bizarr war auch folgender Brauch, der ebenfalls zum erwünschten Kindersegen verhelfen sollte. Die unfruchtbare Frau rief am Grabe einer in der Schwangerschaft Verstorbenen deren Namen an und biß in das auf dem Grabe wachsende Gras, dabei beschwor sie die Verstorbene, ihr ihre Leibesfrucht zu schenken.

Fertilität galt als ein von Person zu Person übertragbares Gut. Davon zeugt auch die Beschreibung der Eberwurz, sie "enzeucht den fruchtbaren Leuten ihre Kraft Kinder zu erzeugen und giebt dieselbige einem andern unfruchtbaren Menschen, welches ein gut Mittel ist, die fast ausgestorbenen Herrn Stands oder Adelige Geschlechter zu erhalten, und



vermittelst fleißigem Gebet und Segen Gottes fortzupflanzen" (Staricius Heldenschatz, 1750).

Das bisher Dargestellte entstammt dem Handwörterbuch des deutschen Aberglaubens (1937, Bd. VIII, S 1407-1415) und zeigt recht gut wie mystifiziert dieses Thema war. Zu diesen Mythen gehört auch die Vorstellung, daß die Ursachen der Infertilität alleine oder vor allem bei der Frau zu suchen sind. Erst den modernen Naturwissenschaften, insbesondere der Andrologie, ist es gelungen mit solchem Irrglauben zu brechen und nach den wirklichen Ursachen der Infertilität zu suchen. Der Andrologie gelang es zu beweisen, daß die eingeschränkte Fertilität auf Seiten des Mannes zu 40 - 50% kausal an der unerwünschten ehelichen Kinderlosigkeit beteiligt ist. Daher wird heute grundsätzlich vor operativen Untersuchungen bei der Frau ein andrologischer Befund gefordert (Schirren, 1982).

Obwohl auch heute noch viele Fragen unbeantwortet sind, ist es dennoch in den vergangenen drei Jahrzehnten seit der Entdeckung der Kapazitation und Akrosomreaktion gelungen sehr viel über die Fertilität zu lernen, wobei immer neue Untersuchungsmethoden und Techniken neue Erkenntnisse ermöglichten.

Ziel der Untersuchungen, die in dieser Arbeit dargestellt werden, ist es den Zustand des Akrosoms unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu beschreiben. Dazu wurden die Spermatozoen mit Hilfe eines speziellen Verfahrens, das die Beurteilung der Vitalität und des akrosomalen Zustandes zulässt, angefärbt. Es wurden sowohl unkapazitierte Spermatozoen kurz nach der Ejakulation untersucht als auch Spermatozoen, die mehrere Stunden in kapazitierenden Medien inkubiert waren. Bei einem Teil der Patienten dieser zweiten Gruppe wurden auch Motilitätsparameter bestimmt.

## 2.1. Morphologie des Spermatozoons

Spermatozoen sind hochspezialisierte Zellen, an denen sich verschiedene morphologische Funktionseinheiten unterscheiden lassen. Im wesentlichen besteht das Spermatozoon aus dem Kopf mit dem Akrosom, dem Hals- oder Verbindungsstück, dem mitochondrientragenden Mittelstück und schließlich dem Schwanz. In den folgenden Abschnitten werden diese "Bauteile" näher erläutert. In Abbildung (1) ist ein Spermatozoon dargestellt.

## 2.1.1 Strukturen des Kopfes

Der Kopf des Spermatozoons beinhaltet den stark kondensierten und durch Disulfidbrücken stabilisierten Zellkern, der dadurch metabolisch weitgehend inert ist, und somit auch gegen eventuelle schädliche äußere Einflüsse geschützt ist (Calvin und Bedford, 1971).

Apikal über dem Zellkern trägt der Kopf das Akrosom, das ein spezialisiertes Lysosom darstellt, welches während der Spermatohistogenese vom Golgiapparat gebildet wird. Das Akrosom beherbergt die lysosomalen Enzyme, die notwendig sind um die Eihüllen zu durchdringen (Allison und Hartree, 1968; Dott und Dingle, 1968).

Der kaudale Teil des Akrosoms wird als Äquatorialssegment bezeichnet. Interessanterweise bleibt dieser Teil des Akrosoms auch nach Ablauf der Akrosomreaktion erhalten (Bedford, 1971).

KOPF

VERBINDUNGSSTÜCK

AKROSOM

POSTAKROSOMALE REGION

MITTELSTÜCK

ENDSTÜCK

HAUPTSTÜCK

Abbildung 1: Spermatozoon (vereinfacht nach Fawcett, 1975).  
Nähere Erläuterungen werden im Text gegeben.

Bedford et. al.(1979) sehen im Äquatorialsegment die Stelle, an der die Fusion zwischen Spermatozoon und Eizelle beginnt. Der postakrosomale Bereich soll dabei zunächst keine Rolle spielen, da die Membran in diesem Bereich durch Disulfidbrücken zum perinukleären Material stabilisiert ist. Andere Autoren beschreiben die sich kaudal an das Äquatorialsegment anschließende postakrosomale Region als den Bereich der Anheftung und Fusion (Barros und Franklin, 1968; Stefanini et. al., 1969; Yanagimachi und Noda, 1970).

Im Hinblick auf die Akrosomreaktion ist bemerkenswert, daß die Region, die unmittelbar apikal zum Äquatorialsegment liegt, während der Akrosomreaktion offenbar eine wichtige Fusionsstelle für die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran ist (Nagae et.al.,1986).

#### 2.1.2. Strukturen des Mittelstückes und des Schwanzes

Der Spermatozoonkopf setzt sich kaudal zunächst in das Verbindungs- oder Halsstück fort, das eine Gelenkfunktion zwischen Kopf und Schwanz übernimmt. Die Struktur dieses Verbindungsstückes ist recht kompliziert, für eine genaue Darstellung wird auf den Übersichtsartikel von Fawcett (1975) verwiesen, der die Zytoarchitektur des Spermatozoons in allen Einzelheiten beschreibt.

An das Verbindungsstück schließt sich der schraubenförmig von Mitochondrien umgebene Anfangsteil des Schwanzes an, der als Mittelstück bezeichnet wird. Beim menschlichen Spermatozoon liegen die Mitochondrien in 15 Windungen End zu End um die longitudinalen Strukturen des Schwanzes. Die Mitochondrien sollen die Energie für die Motilität des Schwanzes liefern (Fawcett, 1975).

Den eigentlichen "Motor" des Schwanzes bildet das Axonem, das aus Mikrotubuli aufgebaut ist, die nach dem im Pflanzen- und Tierreich universell vorkommenden 9+2 Muster angeordnet sind,

d.h. 9 äußere Fibrillen umgeben 2 zentral gelegene Fibrillen kreisförmig. Abb (2) stellt die Anordnung der Mikrotubuli dar. Eine Besonderheit der Säugetierspermatozoen ist es jedoch, daß das Axonem von weiteren 9 Fibrillen umgeben ist, so daß ein 9+9+2 Muster im Querschnitt entsteht. Während die Fibrillen des Axonems elektronenoptisch alle den gleichen Durchmesser besitzen, haben die äußeren Fasern spezies-spezifisch und auch innerhalb einer Spezies verschiedene Durchmesser (Fawcett, 1975). Als Funktion dieser äußeren Fasern wurde zunächst angenommen, daß sie aktiv zur Motilität beitragen und damit gewissermaßen ein "Zusatzmotor" darstellten, um den weiten Weg durch den weiblichen Genitaltrakt bei den Säugern zu überwinden (Fawcett und Ito, 1965; Fawcett, 1970).

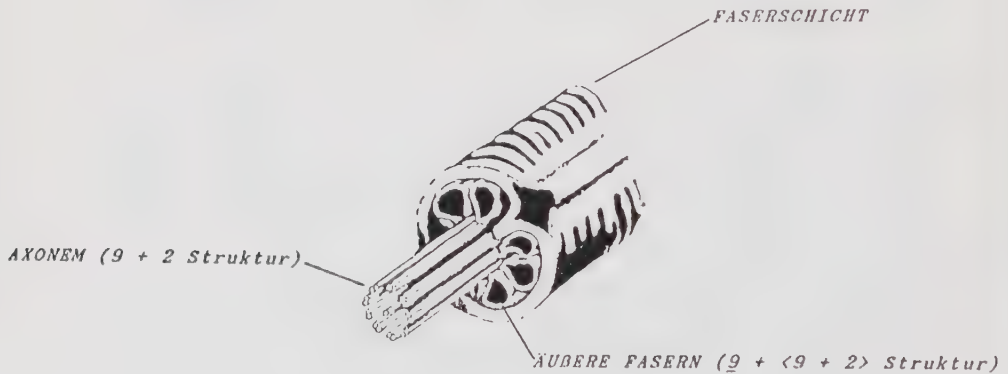


Abbildung 2: Querschnitt durch den Schwanz des Spermatozoons (vereinfacht nach Fawcett, 1975). Weitere Erläuterungen im Text.

Die chemische Analyse aber widerspricht dieser Auffassung, so daß sich die Funktion dieser Fasern wohl eher von ihrer elastischen Rückstellkraft ableitet (Baccetti, et. al, 1973; Price, 1973).

Die bisher beschriebenen Strukturen des Schwanzes werden nach außen hin beim Säugetierspermatozoon durch eine zusätzliche Schicht umgeben, die als Faserschicht bezeichnet wird. Die Funktion dieser Schicht ist nicht bekannt. Morphologisch umgibt sie das Hauptstück des Schwanzes, d.h. sie liegt distal vom Mittelstück und endet vor der Schwanzspitze (Fawcett, 1975).

## 2.2. Veränderungen am Akrosom

Austin (1951) und Chang (1951) beschrieben erstmals, daß die Spermatozoen einige Zeit im weiblichen Genitaltrakt zubringen müssen, bevor sie die Fähigkeit zur Befruchtung erlangen. 1952 wurde von Austin dafür der Begriff Kapazitation geprägt.

Die Akrosomreaktion wurde von Dan (1952, 1954) beim Seeigel und Seestern erstmals beschrieben und von Austin und Bishop (1958) auch bei Säugetiersamenzellen entdeckt.

Mit der Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß im Verlauf der Akrosomreaktion die äußere akrosomale Membran vesikuliert bzw. eine Verschmelzung der Plasmamembran mit der darunter liegenden äußeren akrosomalen Membran stattfindet (Piko und Tyler, 1964).

### 2.2.1. Definition der Kapazitation

Eine Reihe von biophysikalischen und biochemischen Veränderungen, die notwendig sind, um das Spermatozoon auf die Akrosomenreaktion vorzubereiten, werden als Kapazitation bezeichnet (Bedford, 1970; Bedford, 1983). Die Kapazitation dauert beim Menschen zwischen 5 und 6 Stunden (Austin, 1975). Dabei werden offenbar Bestandteile von den Spermatozoenmembranen entfernt, welche diese während der Passage durch den Nebenhoden erworben haben oder die aus dem Seminalplasma stammen (Anouma et. al., 1973). Die Kapazitation führt zu keinen morphologischen Veränderungen (Adams und Chang, 1962; Bedford, 1969).

Außerdem handelt es sich bei der Kapazitation um einen reversiblen Prozeß. Daher können Faktoren, wie sie z.B. im Seminalplasma vorhanden sind, vorher kapazitierte Spermatozoen wieder dekapazitieren. Diese dekapazitierten Spermatozoen können anschließend sogar wieder rekapazitiert werden und Eizellen befruchten (Chang, 1957; Williams et. al., 1967; Davis, 1974). Nach Bedford (1983) ist die Kapazitation im Gegensatz zur Akrosomreaktion ein von Kalzium-Ionen unabhängiger Vorgang.

Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die Veränderungen der Motilität, die im Laufe der Kapazitation auftreten können. Dabei wird die Progressivmotilität des nicht kapazitierten Spermatozoons im Sinne einer Hyperaktivierung von der sogenannten "whiplash" Bewegung (siehe auch 2.7.2.) abgelöst (Yanagimachi, 1970).

### 2.2.2. Definition der Akrosomreaktion

Nur bei einem kapazitiertem Spermatozoon kann es zur Akrosomreaktion kommen. Eine weitere wichtige Voraussetzung für die

Akrosomreaktion ist, daß Kalzium-Ionen vorhanden sind (Yanagimachi und Usui, 1974). Die Akrosomreaktion führt zu Fusionen zwischen der äußeren akrosomalen Membran und der darüber liegenden Plasmamembran. Der Inhalt des Akrosoms, also die akrosomalen Enzyme, die für die Durchdringung der Eihüllen insbesondere auch der Zona pellucida benötigt werden, können nun austreten (Austin, 1975; Bedford und Cooper, 1978). Zu diesen Enzymen zählt die Hyaluronidase (Triana et. al., 1980), das "corona-penetrating-enzyme" (Zanfeld et. al., 1970) und schließlich auch die trypsinähnliche Proteinase Akrosin.

Da zunächst die Membranen als durchlöcherter "Schleier" um den Apex des reagierten Spermatozoenkopfes erhalten bleiben, gehen auch eventuelle Membranrezeptoren des Spermatozoons für komplimentäre Liganden der Zona pellucida nicht verloren (Bedford, 1983).

Nach der Akrosomreaktion ist die weitere Lebenszeit des Säugetierspermatozoons auf ein bis zwei Stunden begrenzt (Fleming und Yanagimachi, 1982). Weil aber die Akrosomreaktion unter natürlichen Bedingungen sehr dyssynchron auftritt, stehen über einen langen Zeitraum vitale akrosomal reagierte Spermatozoen zur Verfügung (Talbot und Franklin, 1976). Das ist biologisch sehr sinnvoll, da zwischen Coitus und Ovulation einige Stunden vergehen können (siehe dazu auch die Diskussion unter 5.4.4.).

Weiterhin wird die Akrosomreaktion dadurch charakterisiert, daß sie nicht nur eine Voraussetzung dafür ist, daß die Spermatozoen die Zona pellucida durchdringen können, sondern auch dafür, daß die Membran später im Bereich des Äquatorial-segments mit der Plasmamembran der Eizelle verschmelzen kann (Yanagimachi und Noda, 1970).

### 2.3. Die Bedeutung des Seminalplasmas für die Kapazitation und Akrosomreaktion

Im ersten Teil unserer Untersuchungen wurden "ungewaschene" Ejakulate verwendet, d.h. die Spermatozoen wurden vor der Färbung nicht vom Seminalplasma getrennt. Daher soll hier auf die Bedeutung des Seminalplasmas für die Vorgänge am Akrosom eingegangen werden.

Wie schon weiter oben erwähnt enthält das Seminalplasma dekapazitierende Faktoren, deren Aufgabe es ist eine vor-schnelle Kapazitation und Akrosomreaktion zu verhindern.

Hier ist besonders das Cholesterin zu nennen, das in Membran-vesikeln enthalten ist, die im Seminalplasma gefunden werden (Davis, 1974; Davis und Niwa, 1974). Wird das Cholesterin aus diesen Membranvesikeln extrahiert, so verlieren diese ihre dekapazitierende Wirkung (Davis und Hungund, 1976).

Neben dem Cholesterin tragen Glykoproteine des Seminalplasmas zur Stabilität des Akrosoms bei und werden während der Kapazitation von der Spermatozoenoberfläche entfernt (Hunter und Nornes, 1969; Srivastava und Gould, 1973; Reyes et. al., 1975; Eng und Oliphant, 1978).

## 2.4. Biochemische Vorgänge an der Akrosommembran

Insbesondere während der Kapazitation, in deren Verlauf keine morphologischen Veränderungen zu beobachten sind, kommt es zu einer Reihe biochemischer Prozesse, welche die Membranen des Spermatozoons auf die Akrosomreaktion vorbereiten.

### 2.4.1. Bestandteile der unkapazitierten Membran

Die Membransysteme des Spermatozoons sind im Prinzip nach dem von Singer und Nicolson 1972 beschriebenen "fluid mosaic model" aufgebaut (Abb. 3). So besteht die Plasmamembran des Spermatozoons aus einer Lipiddoppelschicht, die von Phospholipiden und Sterolen im dynamischen Gleichgewicht mit peripheren und integralen Membranproteinen gebildet wird. Die Membranproteine, aber auch die Lipide, tragen häufig Kohlehydratreste. Die äußere akrosomale Membran ist nach dem gleichen Bauprinzip aufgebaut und liegt direkt unter der Plasmamembran (Langlais und Roberts, 1985)

### 2.4.2. Cholesterin und die akrosomalen Membranen

#### 2.4.2.1. Stabilisierende Eigenschaften des Cholesterins als Membranbestandteil

Menschliche Spermatozoen sind nach der Ejakulation sehr reich an Cholesterin. Das Verhältnis von Cholesterin zu Phospho-

lipiden (c/p-Verhältnis) wird für frisch ejakulierte humane Spermatozoen mit 0.99 angegeben (Minassian und Turner, 1966; Darin-Bennet und White, 1977). Biologische Membranen werden generell durch den Cholesterinanteil besonders stabil (Karlson, 1979). Es konnte gezeigt werden, daß eine artifizielle Erhöhung des c/p-Verhältnisses in der Membran die Akrosomreaktion verhindert (Davis, 1978). Umgekehrt gilt, daß die Kapazitation mit der Entfernung von Cholesterin und damit einer Abnahme des c/p-Verhältnisses einhergeht (Davis et.al., 1979; 1980).

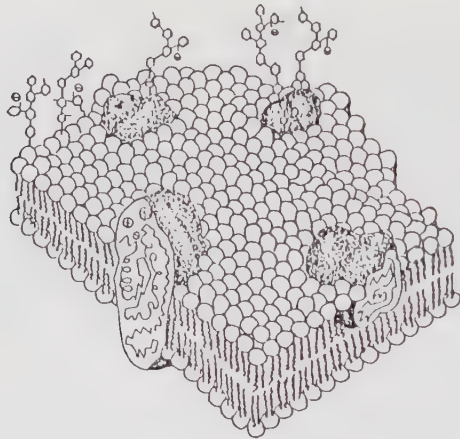


Abbildung 3: Schema des "fluid-mosaic" Modells biologischer Membranen (nach Singer und Nicolson, 1972). Die Abbildung zeigt die Phospholipiddoppelschicht biologischer Membranen, in der große Proteinkomplexe "schwimmen". Der polare Anteil dieser Moleküle ragt nach außen, der lipophile steckt in der Membran. Einige der Proteine, aber auch Lipide, tragen Kohlehydratreste.

Beachtenswert ist, daß die Permeabilität des Akrosoms für Kalzium-Ionen mit der Abnahme des Cholesterinanteils in der Membran zunimmt. Kalziumionen gelten als unverzichtbar für die Induktion der akrosomalen Reaktion.

#### 2.4.2.2. Transportsysteme für die Entfernung von Cholesterin aus der Plasmamembran

Cholesterin ist eine lipophile Substanz, die in wässrigen Medien nicht löslich ist. Daher ist es notwendig, daß es an Trägermoleküle gebunden wird, bevor es die Lipiddoppelschicht der Membran während der Kapazitation verlassen kann. Folgende Trägersysteme kommen dafür unter natürlichen Bedingungen in Frage:

1. High-density-Lipoproteine
2. Apolipoprotein A<sub>1</sub>
3. Albumin

(Glomset, 1968; Quarfordt und Hildermann, 1970; Stein und Stein, 1973)

Die Vorgänge, die zur Reduzierung des Cholesterinanteils in der Membran und zur Kapazitation führen sind unter 2.5.2. genau beschrieben.

#### 2.4.3. Phospholipide als Membranbestandteil

Hauptbestandteil biologischer Membranen sind Phospholipide. Phospholipidmoleküle sind chemisch Phosphodiester. Dabei ist

die Phosphorsäure einerseits mit einem Glycerinderivat (meist Diacylglycerin) oder Spingosinderivat und andererseits mit Cholin, Äthanolamin, Serin, Inosit oder Glycerin verestert (Karlson, 1977). Für die Spermatozoenmembran spielt mengenmäßig das Lecithin (Phosphatidylcholin) eine besonders wichtige Rolle (Ahluwaila und Holman, 1969). Bei physiologischen pH trägt die Phosphatgruppe des Moleküls eine negative Ladung, während der Cholinrest eine positive Ladung trägt, so daß ein Zwitterion vorliegt (Karlson, 1977). Für die Funktion des Moleküls ist entscheidend, daß es sowohl polare (hydrophile) als auch im Bereich der Fettsäurereste ungeladene (lipophile) Strukturen besitzt. Das Verhältnis polarer zu apolarer Molekülanteile verändert sich dadurch, daß die unten aufgezählten Enzymsysteme auf das Molekül einwirken. Diese Veränderungen haben weitreichende Auswirkungen auf die Stabilität der beteiligten Membranen (Karlson, 1977; Langlais und Roberts, 1985).

1. Phospholipase A<sub>2</sub>: Es konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym im menschlichen Ejakulat vorhanden ist (Kunze et. al., 1974; Langlais et. al., 1982; Thakkar et. al., 1984). Innerhalb der Spermatozoen ist die Phospholipase A<sub>2</sub> hauptsächlich im Bereich des Akrosoms lokalisiert. So konnte bei akrosomenlosen Spermatozoen nur eine geringe Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen werden, die offenbar membrangebunden war (Langlais und Roberts, 1985).

Die Wirkung der Phospholipase ist kalziumionenabhängig (Thakkar et. al., 1984). Das ist insofern wichtig, da das Akrosom erst im Laufe der Kapazitation für Kalziumionen permeabel wird. Gleichzeitig ist bekannt, daß diese Ionen eine Voraussetzung für die Akrosomreaktion sind. Es kann daher angenommen werden, daß die Phospholipase zumindest zu einem der kalziumabhängigen Mechanismen gehört, die zur Akrosomreaktion beitragen. Zudem verhindern in vitro Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitoren die Akrosomreaktion (Lui und Meizel, 1979).

Die biochemische Funktion der Phospholipase A<sub>2</sub> besteht darin, von den Membranphospholipiden hydrolytisch Fettsäuren abzuspalten, so daß Lysophospholipide und freie Fettsäuren entstehen (Mayes, 1979; Langlais und Roberts, 1985).

Phospholipase A<sub>2</sub> gehört zu den wenigen Enzymen, die ein positives "feed-back" zeigen, d.h. sie wird durch die Produkte der von ihr gesteuerten Reaktion stimuliert (Jain und de Haas, 1983). Diese Eigenschaft hat zur Folge, daß die Reaktion, wenn sie einmal in Gang gekommen ist, sich lawienartig verstärkt und in der Regel unaufhaltsam abläuft. Das deckt sich gut mit der Beobachtung, daß die Akrosomreaktion (im Gegensatz zur Kapazitation) irreversibel ist.

2. Lecithin-Cholesterin Acyltransferase (LCAT) und high-density-Lipoproteine (HDL): An anderer Stelle in dieser Arbeit (2.5.2.) wird genauer auf dieses Enzym-Transportproteinsystem eingegangen. Hier sei nur soviel gesagt, daß auch bei dieser Reaktion Lysophospholipide entstehen.
3. Lysophospholipasen: Von den Lysophospholipiden, die bei den Reaktionen der unter 1. und 2. aufgezählten Enzymsysteme entstanden sind, können die Lysophospholipasen hydrolytisch den verbliebenen Fettsäurerest abspalten, so daß wiederum eine freie Fettsäure und der Rest des Glycerinmoleküls, welches über eine Phosphatgruppe mit einer Stickstoff-Base verbunden ist, entstehen (Mayes, 1979; Langlais und Roberts, 1985).

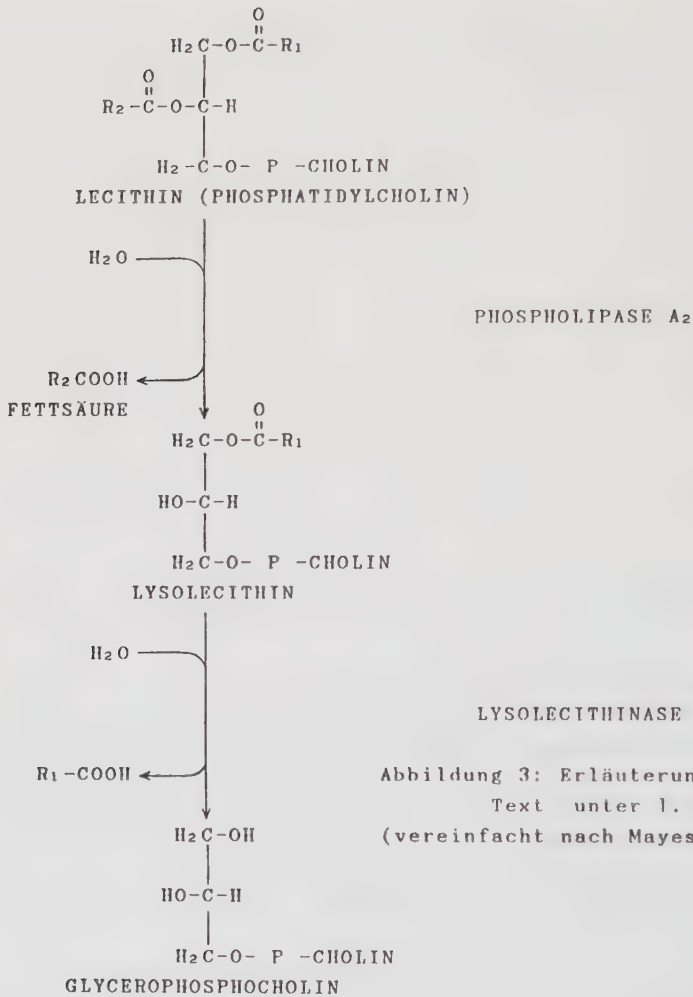


Abbildung 3: Erläuterungen im  
Text unter 1. und 3.  
(vereinfacht nach Mayes, 1979)

## 2.5. Modell der Kapazitation und Akrosomreaktion auf molekularer Ebene

Von Langlais und Roberts wurde 1985 ein verständliches und zusammenhängendes Modell der Kapazitation und Akrosomreaktion veröffentlicht, das der folgenden Darstellung zu Grunde liegt.

### Legende für Abbildung (4) bis (7)



Phospholipidmolekül



Steroid sulfatase



Albumin, Lipoprotein A<sub>1</sub>



HDL



Phospholipase

Daneben sind in den Abbildungen noch diverse Proteine gezeigt, die periphere Membranproteine und den akrosomalen Inhalt darstellen.

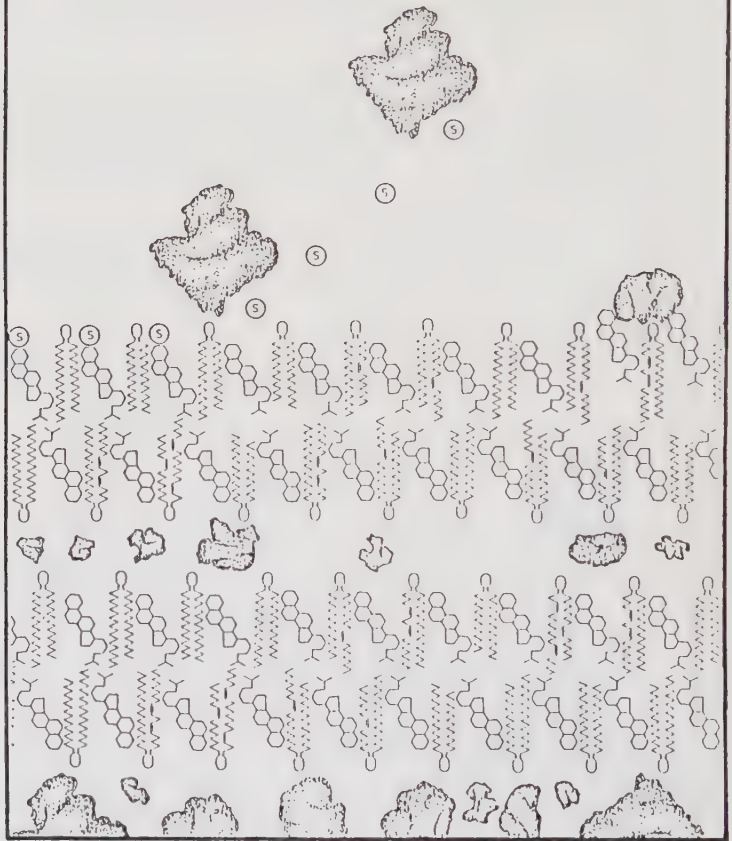


Abbildung 4: Die Abbildung stellt schematische die äußere akrosomale Membran und die darüber liegende Plasmamembran dar. Die Steroidsulfatase spaltet gerade Sulfatreste vom Membrancholesterin ab (Abbildung vereinfacht nach Langlais und Roberts, 1985)

### 2.5.1. Die Einwirkung von Sterolsulfatase auf die akrosomalen Membranen

Ein beträchtlicher Teil des Cholesterins in dem Bereich der Plasmamembran, der über der äußeren akrosomalen Membran liegt, ist kovalent über Hydroxylgruppen an Sulfatreste gebunden. Alleine die Lokalisation lässt vermuten, daß diesen Cholesterinsulfaten eine besondere Bedeutung für die Funktionen des Akrosoms zukommt (Langlais et. al., 1981). Entsprechend fällt der Steroidsulfatase, die während der Kapazitation die Sulfatreste vom Cholesterin abspaltet, eine wichtige Aufgabe zu.

Steroidsulfatase konnte beim Menschen im Eileiter, im Endometrium und in den Flüssigkeit des Graafischen Follikels nachgewiesen werden (Lalumiere et.al., 1976).

Die Sterolsulfate haben zum einen membranstabilisierende Eigenschaften, was am Modell der Erythrozytenmembran nachgewiesen wurde (Bleau et.al., 1974; 1975). Zum anderen verhindern sie den Cholesterin-Efflux aus der Membran und garantieren so ein hohes c/p-Verhältnis (Langlais et. al., 1981).

Eine weitere möglicherweise wichtige Eigenschaft der Steroidsulfate, die hier nur am Rande erwähnt werden soll, ist ihre hemmende Wirkung auf die akrosomale Protease Akrosin. Das konnte bisher für den Eber (Burck und Zimmermann, 1980) und den Hamster (Bouthillier et. al., 1984) nachgewiesen werden. Abbildung (4) zeigt den Vorgang, wie die Steroidsulfatase Sulfatreste vom Membrancholesterin abspaltet.

### 2.5.2 Reduzierung des Cholesterinanteils in der Plasmamembran

Im Abschnitt 2.4.2.2. wurde bereits darauf eingegangen, daß

das lipophile Cholesterin von Transportsystemen aus der Plasmamembran entfernt wird. Abbildung (5) illustriert diesen

Vorgang, zu dem hier einige Erläuterungen gegeben werden sollen.

- Albumin, das in großen Mengen in den Flüssigkeiten des Eileiters nachgewiesen wurde (Beier, 1974; Shalgi et. al. 1973) und damit quantitativ das wichtigste Transportsystem darstellen dürfte, stimuliert darüberhinaus Enzyme wie die Phospholipase A<sub>2</sub> und LCAT (Langlais, 1981).

Die Tatsache, daß Albumin als Transportvehikel für Cholesterin dient, wird durch die Beobachtung untermauert, daß sich die fördernde Wirkung von nativem Albumin auf die Fertilisation verstärkt, wenn es zuvor von Lipiden gereinigt wird (Davis, 1980; Lui und Meizel 1977). Umgekehrt schwächt sich die Wirkung des Albumins ab, wenn es zuvor mit Cholesterin gesättigt wurde (Davis und Byrne, 1980).

- Lipoprotein A<sub>1</sub>, HDL, und LCAT: Weitere Transportsysteme für das Cholesterin sind das Lipoprotein A<sub>1</sub>, dessen Spiegel nach der Ovulation bei der Frau ansteigt (Schaefer et.al., 1983) und das System HDL/LCAT. Sowohl HDL (Simpson et. al., 1980) als auch LCAT konnten in menschlicher Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden. Auf HDL werden Cholesterinester übertragen, die sich aus Cholesterin und Phosphatidylcholinen unter Einwirkung des Enzyms LCAT bilden. Dabei entstehen neben den genannten Cholesterinestern noch Lysolecithine (siehe auch 2.4.4.), die in Bezug auf die Plasmamembran fusogene Eigenschaften besitzen (Mayes, 1979; Langlais und Roberts, 1985). Der Vorgang der Fusion zwischen der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran wird unter 2.5.4. dargestellt.

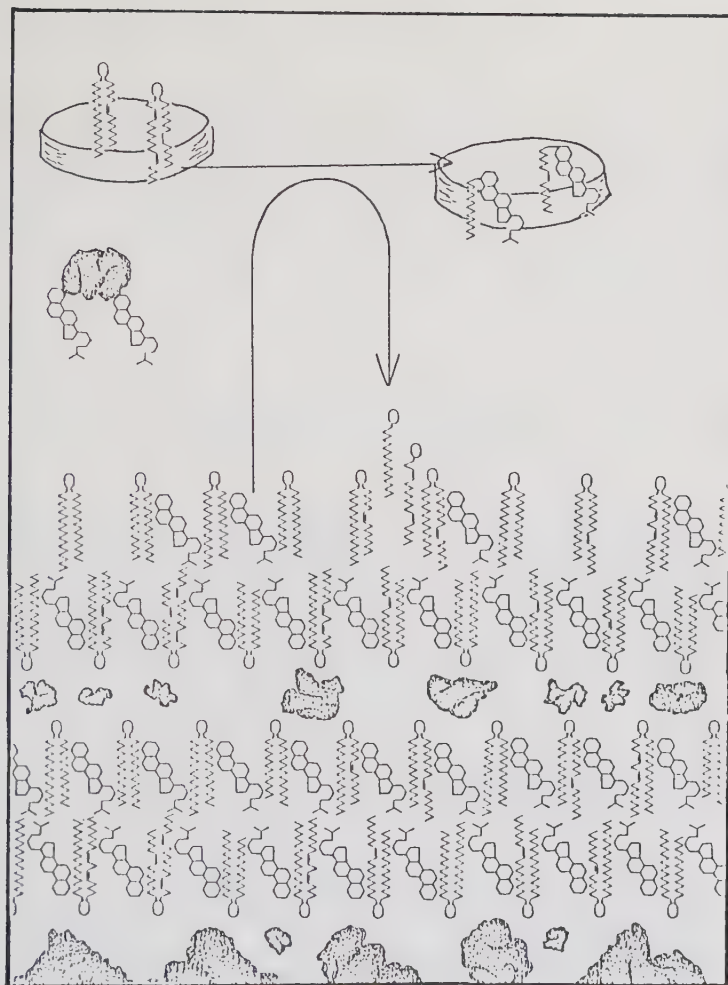


Abbildung 5: Die Abbildung stellt die Vorgänge dar, welche zu einer Reduzierung des Cholesterinanteils an der Membran führen. Nähere Erläuterungen werden im Text gegeben. (Abbildung vereinfacht nach Langlais und Roberts, 1985)

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß verschiedene Vorgänge während der Kapazitation dazu führen, daß die Plasmamembran des Spermatozoons Cholesterin verliert und damit Stabilität einbüßt, jedoch an Permeabilität besonders für Kalziumionen gewinnt. Die Kalzium-Ionen stimulieren wiederum das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub>, das eine wichtige Rolle für die Produktion fusiogener Lipide spielt.

### 2.5.3. Bedeutung des Phospholipidmetabolismus für die Kapazitation und Akrosomreaktion

Wie schon unter 2.4.4. dargestellt wurde, wirken auf die Phospholipide der Plasmamembran die kalziumabhängige Phospholipase A<sub>2</sub>, LCAT, und Lysophospholipasen ein, die dazu führen, daß Lysophospholipide und freie Fettsäuren entstehen. Abbildung (6) stellt die Vorgänge an der Plasmamembran dar, deren Ergebnis die Bildung fusiogener Lipide ist.

Conway und Metz (1971) hatten erstmals die Hypothese aufgestellt, daß die Phospholipasen durch ihre Reaktionsprodukte die akrosomale Spermatozoenmembran zu destabilisieren vermögen und damit zur Fusion zwischen äußerer akrosomaler und Plasmamembran führen. Inzwischen unterstützen mehrere Untersuchungen diese Annahme (Gabara et.al.,1973; Fleming und Yanagimachi,1981; Langlais et.al.,1982; Ohzu und Yanagimachi, 1982;Meizel und Turner,1983;Fleming und Yanagimachi,1984).

Eine Voraussetzung dafür, daß die Lysophospholipide zur Fusion zwischen äußerer akrosomaler Membran und Plasmamembran führen, ist jedoch, daß der Cholesterinanteil an der Membran niedrig ist, da Cholesterin auch Membranen, die reich an Lysophospholipiden sind, zu stabilisieren vermag, indem es den Platz des vom Phospholipid abgespaltenen Fettsäurerestes in der Membran einnimmt. Dadurch wird das keilförmige Lysophospholipidmolekül zu einer zylindrischen Form ergänzt, die der Molekülform des intakten Phospholipides entspricht und

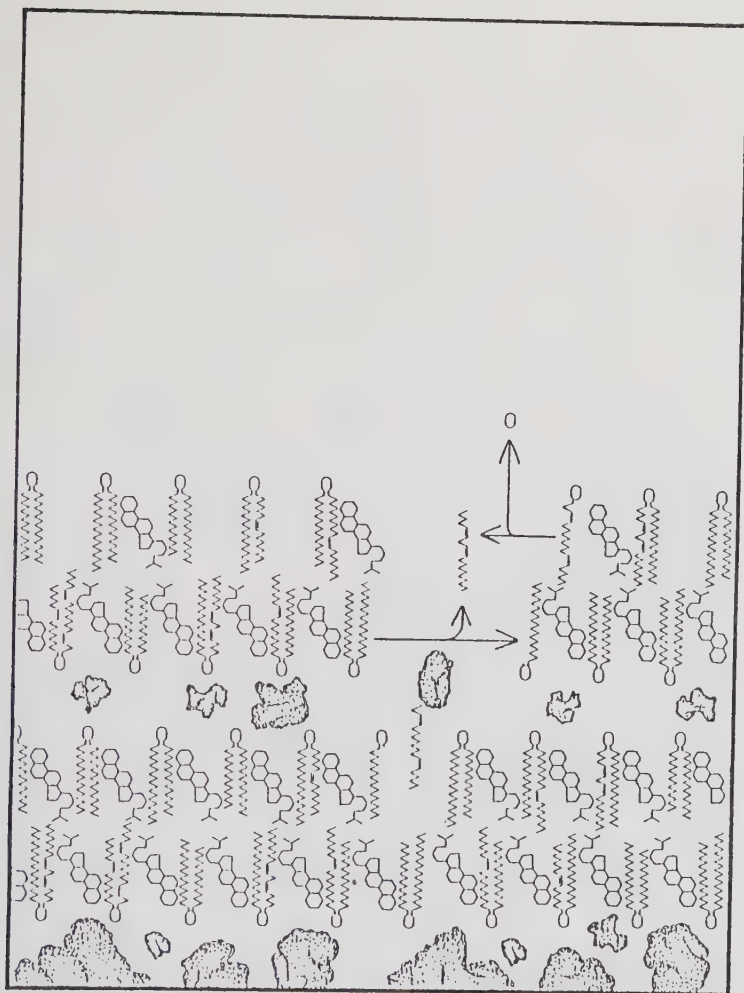


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt die Entstehung der Lysophospholipide und freien Fettsäuren unter Einwirkung der entsprechenden Enzyme. Einzelheiten im Text. (Abbildung vereinfacht nach Langlais und Roberts, 1985)

somit nicht mehr fusiogen wirkt (Rand et.al., 1975). Die Reduzierung des Cholesterinanteils an der Plasmamembran (Senkung des c/p- Verhältnisses) ist also nicht nur deshalb nötig, weil damit die Kalziumionenpermeabilität erhöht wird, welche über die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> zur Bildung der Lipophospholipide führt, sondern auch deshalb, weil die fusiogenen Eigenschaften der Lipophospholipide nur dann wirksam werden, wenn das c/p-Verhältnis niedrig ist.

Den Vorgang der Fusion kann man sich nun so vorstellen, daß es in bestimmten Bereichen (Domänen) der Plasmamembran zur vorübergehenden Anreicherung von Lysolipiden kommt, was zu micellären Turbulenzen führt. Diese Turbulenzen sind die Ursache für das Verschmelzen der übereinander liegenden Membransysteme der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran. Die Membranen stabilisieren sich in ihrer neuen Anordnung als gemischte Membranvesikel dadurch, daß die Lipophospholipide lateral in die Membran diffundieren (Langlais und Rogers, 1985).

Zu den micellären Turbulenzen kann es deshalb kommen, weil bei den Lysophospholipiden ein weitaus größerer Anteil des Moleküls polar und damit hydrophil ist als bei den Phospholipiden (Robinson und Saunders, 1958; Rand et. al., 1975). Hinzu kommt, daß die räumliche Anordnung der Lysophospholipide keilförmig ist im Gegensatz zu den zylindrischen Phospholipiden. Diese Keilform des Moleküls begünstigt die Ausbildung starker Krümmungsradien der Membran, so wie das bei Micellen bzw. den entstehenden Membranvesikeln der Fall ist (Rand et.al., 1975).

Auch bei Zellfusionen spielen die Lysophospholipide eine entscheidende Rolle, denn auch da verschmelzen zwei Membransysteme miteinander (Croce et. al., 1971; Gledhill et. al., 1972)

Offenbar fördern nicht nur Lysophospholipide die Akrosomreaktion, sondern auch die freien Fettsäuren, die ebenfalls durch die Phospholipase A<sub>2</sub> freigesetzt werden (Fleming und Yanagimachi, 1984).

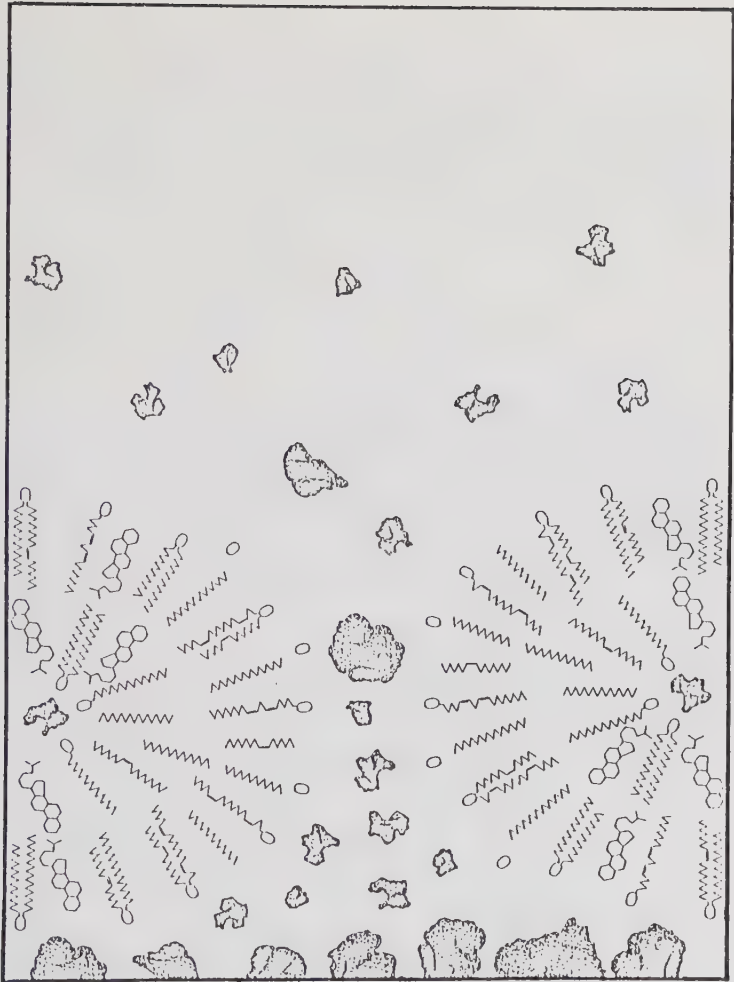


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt die Fusion zwischen äußerer akrosomaler Membran und Plasmamembran. Einzelheiten im Text. (Abbildung vereinfacht nach Langlais und Roberts, 1985)

Die Vesikel, welche im Laufe der Akrosomreaktion entstehen, setzen sich in etwa gleichen Teilen aus Bestandteilen der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran zusammen (Rusell et. al., 1979).

Abbildung (7) stellt die beschriebenen Vorgänge, die zur Fusion der Membransysteme führen, dar.

## 2.6. Morphologischer Ablauf der Akrosomreaktion

Bei elektronenoptischen Untersuchungen an menschlichen Spermatozoen konnten Nagae et.al. (1986) fünf wesentliche morphologische Schritte der Akrosomreaktion unterscheiden:

Schritt 1: Das Akrosom ist intakt. Es sind noch keine morphologisch erkennbaren Veränderungen aufgetreten.

Schritt 2: Die Matrix des Akrosoms schwillt an, die Membranen sind weiterhin intakt.

Schritt 3: In diesem Stadium werden typischerweise Vesikel innerhalb des Akrosoms beobachtet. Den Untersuchern fiel auf, daß diese überwiegend von der äußeren akrosomalen Membran abstammen, seltener sowohl von der äußeren akrosomalen als auch der Plasmamembran. Ein weiteres morphologisches Zeichen zu dieser Zeit ist die Kräuselung (im engl. Original "ruffling") der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran.

Schritt 4: Die akrosomale Matrix ist jetzt weitgehend verloren, während Plasmamembran und äußere akrosomale Membran im vorderen Bereich des Äquatorialegmentes und der akrosomalen Kappe verschmolzen sind.

Schritt 5: Die innere akrosomale Membran ist nun exponiert, da sowohl die Matrix als auch die Membranbestandteile der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran entfernt sind. Das Äquatorialsegment jedoch ist gewöhnlicherweise erhalten. Bei einigen Spermatozoen werden in der Nähe der inneren akrosomalen Membran Vesikel unterschiedlicher Größe und Form gefunden.

Ähnlich wie hier für humane Spermatozoen dargestellt, beschreibt Jones (1973) die Vorgänge für Eberspermatozoen. Diese morphologischen Beobachtungen lassen sich im wesentlichen gut in Einklang mit dem von Langlais (siehe 2.5.) vorgeschlagenen Modell der Kapazitation und Akrosomreaktion bringen. So dürfte das anfängliche Anschwellen und die Dekondensation des Akrosoms auf Permeabilitätsänderungen der akrosomalen Membranen während der Kapazitation zurückzuführen sein.

Langlais geht jedoch nicht auf die unter Schritt 3 beschriebenen intraakrosomalen Vesikel ein, sondern beschäftigt sich vielmehr mit dem Schicksal der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran und erklärt die biochemischen Hintergründe für das morphologische Phänomen der Membranfusion.

## 2.7. Motilität

Neben der Kapazitation und der Akrosomreaktion ist die Motilität zumindest unter in vivo Bedingungen eine weitere unbedingte Voraussetzung für die Fertilität, da die Spermatozoen nur auf Grund ihrer kräftigen Propulsivbewegungen die physiologischen Barrieren des weiblichen Genitaltraktes überwinden können. Umgekehrt lässt sich jedoch aus einer regelrechten Motilität nicht schließen, daß das Spermatozoon auch befruchtungsfähig ist (Aitken, 1983).

### 2.7.1. Progressivmotilität

Nachdem das Ejakulat im Verlaufe des Koitus in der Vagina deponiert wurde, müssen die Spermatozoen den Zervixmukus durchdringen und die weite Strecke durch das Uteruskavum und die Tuben bis an den Ort der Befruchtung in der Ampulle zurücklegen (Hafez, 1973).

Diesen Anforderungen sind die Spermatozoen dadurch angepasst, daß sie ein Motilitätsmuster zeigen, das ihnen erlaubt, mit Hilfe der Progressivmotilität rasch große Distanzen zu überwinden. Die Progressivmotilität zeichnet sich durch symmetrische Schwanzausschläge mit geringer Amplitude aus, was zu einem linearen Bewegungsmuster führt (Suarez et. al., 1983).

Die Belastung, den dieser weite Weg, welchen die Spermatozoen zurückzulegen haben, darstellt, dürften ein wichtiger Selektionsmechanismus sein, da nur sehr wenige Spermatozoen den Weg bis in die Ampulle bewältigen. Doak et. al. (1967) gibt an, daß nur 5 - 100 Spermatozoen im Eileiter gefunden werden. Auch Cummings und Yanagimachi (1982) nennen eine Zahl in dieser Größenordnung.

Die erstaunliche Leistungsfähigkeit einiger Spermatozoen zeigt sich jedoch darin, daß im weiblichen Genitaltrakt (Zervixmukus) bis zu einer Woche motile Spermatozoen gefunden

werden und dort ihre Fähigkeit zur Fertilisation immerhin drei Tage lang behalten sollen (Page et. al., 1972).

Spermatozoen, die aber in irgendeiner Weise funktionell oder morphologisch eingeschränkt sind, dürften keine Chance haben bis an den Ort der Befruchtung vorzustoßen. Diese Tatsache spielte eine Rolle bei der Entscheidung, nur morphologisch intakte Spermatozoen bei der Auswertung der vorliegenden Versuche zu berücksichtigen (siehe auch 5.2.).

Im Zusammenhang mit der großen Bedeutung der Lipide für die Kapazitation und Akrosomreaktion ist es interessant, daß sich die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran offenbar auch auf die Motilität auswirkt. So ist die Konzentration der Dokosahexansäure bei Spermatozoen mit schlechter Motilität geringer als bei Spermatozoen mit normaler Motilität. Die Dokosahexansäure ist die mengenmäßig wichtigste ungesättigte Fettsäure in den Membranphospholipiden menschlicher Spermatozoen (Nissen und Kreysel, 1982).

## 2.7.2. Hyperaktivierte Bewegung ("whiplash-Bewegung")

### 2.7.2.1. Beobachtung und Beschreibung der Hyperaktivierung

Schon 1963 entdeckten Hammer und Williams, daß der Sauerstoffverbrauch von im Uterus inkubierten Kaninchenspermatozoen um das vierfache des Ausgangswertes ansteigt.

Die Untersuchungen von Mounib und Chang (1964) bestätigten das und konnten außerdem zeigen, daß auch die glykolytische Aktivität der Spermatozoen zunimmt, wenn sie unter kapazitierenden Bedingungen inkubiert werden.

Johnson et.al. (1981) berechnen, daß im Laufe der Kapazitation durch die Hyperaktivierung der Spermatozoen der Energieumsatz um das zwanzigfache ansteigt.

Eine Veränderung im Bewegungsmuster inkubierter Spermatozoen beobachtete und beschrieb Yanagimachi (1969; 1970) als erster

beim Goldhamster. Er prägte den Begriff "Hyperaktivierung" dafür.

Ein vergleichbares Verhalten der Spermatozoen konnte für eine Vielzahl von Spezies beschrieben werden (siehe Übersichtsartikel: Bedford, 1983; Chang, 1984) so auch für den Menschen (Burkman, 1984). Wissenschaftler, welche die hyperaktivierte Bewegung der Spermatozoen beobachteten, benützten im Englischen verschiedene recht anschauliche Begriffe wie "bobbing" (= ruckweise bewegen, springen; Gwatkin und Anderson, 1969), "serpentine" (= schlangenartig; Yanagimachi, 1972) oder "whiplash" (= peitschenartig; Fraser, 1977), um sie zu beschreiben.

Es wird angenommen, daß die hyperaktivierte Motilität des reifen Spermatozoons zunächst durch Faktoren der Plasmamembran unterdrückt wird, die im Verlauf der Kapazitation entfernt werden. So zeigen in Versuchen unkapazitierte, jedoch demembranierte Spermatozoen verschiedener Tierarten und des Menschen hyperaktivierte Bewegungen. Die Hyperaktivierung resultiert also vermutlich aus Membranveränderungen, die wiederum ein Ergebnis der Kapazitation sind. Die genauen biochemischen Veränderungen, die zur Hyperaktivierung führen, liegen aber noch im Dunklen (Cumings, 1982).

Zunächst wurden alle Beobachtungen der hyperaktivierten Bewegung nur unter in vitro Bedingungen gemacht. Später gelang es aber, auch aus dem Eileiter verschiedener Spezies Spermatozoen zu gewinnen, die "whiplash" Bewegungen zeigten (Yanagimachi und Mahi, 1976; Cumings und Yanagimachi, 1982). Es gelang sogar, durch die transparenten Wände des Hamstereileiters die hyperaktivierten Spermatozoen in situ zu beobachten (Katz und Yanagimachi, 1980). Daher darf man wohl zurecht die in vitro Beobachtungen auf die Verhältnisse in vivo übertragen.

#### 2.7.2.2. Hyperaktivierung und Akrosomreaktion

Hyperaktivierung und Akrosomreaktion sind zwei Ereignisse, die zwar in der Regel zeitlich in einem gewissen Zusammenhang auftreten, jedoch prinzipiell unabhängig voneinander sind und daher als getrennte Phänomene betrachtet werden sollten (Yanagimachi, 1981).

Das genaue zeitliche Verhältnis von Akrosomreaktion und Hyperaktivierung ist in der Literatur nicht eindeutig beschrieben (Chang, 1984).

Ein gutes Beispiel dafür, daß die Hyperaktivierung bzw. die Motilität insgesamt und die Akrosomreaktion unabhängig voneinander auftreten, sind Patienten mit Kartagenersyndrom deren Spermatozoen durch einen Defekt immotil aber vital sind. Die Spermatozoen dieser Patienten gehen eine normale Kapazitation und Akrosomreaktion ein und können sogar mit zona-freien Hamstereiern (Testverfahren nach Yanagimachi et.al., 1976) fusionieren, wenn sie unter in vitro Bedingungen in direkten Kontakt mit den Eizellen gebracht werden (Aitken, 1983).

Gemeinsam ist aber sowohl der Akrosomenreaktion als auch der Hyperaktivierung, daß die Anwesenheit von Kalzium-Ionen notwendig ist (Yanagimachi und Usui, 1974; Aonuma et.al., 1980; Talbot et.al., 1976).

#### 2.7.2.3. Vergleich der hyperaktivierten Motilität mit der Progressivmotilität

Das Schlagmuster des Schwanzes bei frisch ejakulierten bzw. nicht kapazitierten Spermatozoen unterscheidet sich vom hyperaktivierten Bewegungsmuster dadurch, daß die Schlagamplitude wesentlich kleiner ist. Spezielle kinemato-graphische Aufzeichnungen konnten beweisen, daß die Amplitude der Schwanzausschläge im Rahmen der Hyperaktivierung zunimmt (Katz et. al., 1978).

Die Schwanzausschläge der nicht hyperaktivierten Spermatozoen sind symmetrisch, was dazu führt, daß sie auf geraden Bewegungsbahnen schwimmen und keine Richtungsänderungen ausführen können. Dagegen bedingen die asymmetrischen Schwanzausschläge der hyperaktivierten Spermatozoen, daß diese auf kreisförmigen Bewegungsbahnen schwimmen (Suarez et. al., 1983; Cummings, 1982).

Die Lateralausschläge des Kopfes und die Kopfgeschwindigkeit während des Lateralausschlages sind für hyperaktivierte Spermatozoen wesentlich größer als für nicht hyperaktivierte Spermatozoen. Schlagfrequenz und die Geschwindigkeit des Spermatozoons insgesamt unterscheiden sich nicht sehr stark in beiden Zuständen (Suarez et. al., 1983).

#### 2.7.2.4. Funktion der hyperaktivierten Motilität

Nach der Entdeckung dieses sehr auffälligen Phänomens der hyperaktivierten Motilität stellte sich die Frage nach dem "warum", also der Funktion der hyperaktivierten Motilität. Dazu gibt es mehrere Theorien:

- Bedford (1983) schlägt vor, daß das Spermatozoon, indem es in den hyperaktivierten Zustand übergeht, gewissermaßen in einen anderen Gang schaltet, so daß es mehr Schub bekommt, um die Eihüllen zu durchdringen. Damit besäßen die Spermatozoen neben den akrosomalen Enzymen ein zweites Prinzip, um den Kumulus und die Zona pellucida zu penetrieren (Bedford, 1983). Die akrosomalen Enzyme würden dann die Rolle eines "Lubrikants", das den Kopf des Spermatozoons schlüpfrig macht, übernehmen, so wie das von Cummings (1982) für die akrosomale Hyaluronidase angenommen wurde.
- Katz et.al. (1978) betonen, daß sich die Chance des Spermatozoons, in der Ampulle des Eileiters auf die Eizelle zu treffen durch die hyperaktivierte Motilität erhöht, da der Spermatozookopf auf Grund der

ausgeprägten Lateralbewegung ein größeres Volumen durchmisst.

- Suarez (1983) führt an, daß die Kreisbahnen, auf denen die hyperaktivierten Spermatozoen schwimmen, die Gefahr verringern, daß sich die Spermatozoen in den Krypten der Ampulle verfangen. Gleichzeitig bewirken diese Kreisbahnen aber auch, daß das Spermatozoon den Bereich der Ampulle nicht verlässt und im Peritonealraum verloren geht.
- Ein weiterer Aspekt könnte sein, daß das Spermatozoon durch seine heftigen Bewegungen die lokale Mikroumgebung in Bewegung hält und damit den Austausch von Metaboliten oder den Kontakt mit stimulierenden Faktoren fördert (Lighthill, 1976; Katz et.al., 1978; Katz und Yanagimachi, 1980).

Da sich die dargestellten Theorien gegenseitig nicht ausschließen, ist es naheliegend davon auszugehen, daß sie verschiedene Aspekte eines Vorgangs darstellen.

Für zona-freie Mäuseeizellen (Fraser, 1981; 1982) und für die Penetration zona-freier Hamstereizellen durch Fledermaus-spermatozoen (Lambert, 1981) konnte jedenfalls gezeigt werden, daß die Zahl der befruchteten Eizellen vom Grad der Hyperaktivierung der Spermatozoen abhängt.

### 3.1. Auswahl der Patienten

Bei den untersuchten Patienten handelt es sich um Männer, die wegen Kinderwunsch die andrologische Sprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik München aufsuchten. Daneben wurden Untersuchungen an einer Gruppe von Patienten mit Polyzoospermie durchgeführt, die für diese Nachuntersuchungen eigens angeschrieben worden waren.

### 3.2. Ablauf der Untersuchung

Das Ejakulat wurde durch Masturbation nach einer mehrtägigen sexuellen Karenz (4-6 Tage) in der Klinik gewonnen. Nach 30 Minuten wurde ein Teil des verflüssigten Ejakulates für die im folgenden dargestellten Untersuchungen entnommen, während der Rest nach den üblichen Kriterien im andrologischen Routinelabor untersucht wurde.

Bei einer ersten Gruppe von Patienten (n=89) wurden die Ejakulate im nativen oder ungewaschenen Zustand untersucht, d.h. das Seminalplasma wurde vor der Untersuchung nicht abgetrennt und verworfen.

Der Farbstoff Trypanblau wurde für diese Untersuchungen in einem nicht kapazitierendem Puffer (siehe 3.4.1.) gelöst. Mit diesem Puffer wurden die Spermatozoen nach der Trypanblaufärbung und vor der Fixierung gewaschen. Durch diese Vorgehensweise wurde der Zustand der Spermatozoen nach der Ejakulation ohne kapazitierende Einflüsse von außen untersucht.

In einer zweiten Gruppe von Patienten und bei Männern mit Polyzoospermie wurden die Spermatozoen zunächst vom Seminal-

plasma getrennt und gewaschen, bevor sie gefärbt wurden. Für diese Untersuchungen wurde ein kapazitierendes Puffersystem verwendet (siehe 3.4.2.). Um den Verlauf der Akrosomreaktion verfolgen zu können, wurde bei 37 C eine Kinetik erstellt. Dafür wurden Teilportionen der Ejakulate jeweils zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden gefärbt. Gleichzeitig wurden auch mit Hilfe der "multiple exposure photography" (modifiziert nach Overstreet et. al., 1979) die Motilität der Spermatozoen zu den entsprechenden Zeitpunkten festgehalten.

### 3.3. Sperma-Analyse

Während die Untersuchungen vorgenommen wurden, die spezieller Gegenstand dieser Arbeit sind wurden gleichzeitig im andrologischen Routinelabor Ejakulatvolumen, Spermatozoendichte, Motilität und der Anteil der Spermatozoen mit normaler Morphologie bestimmt (nach Schirren, 1982).

Später wurden die Patienten nach den im Routinelabor erhobenen Parametern in die folgenden Diagnosegruppen aufgeteilt, Normozoospermie ( $\geq 20$  Millionen/ml Spermatozoen, Motilität  $\geq 50\%$ , normale Morphologie  $\geq 50\%$ ), Oligozoospermie ( $< 20$  Millionen/ml Spermatozoen), Asthenozoospermie (Motilität  $< 50\%$ , normale Spermatozoendichte und Morphologie) und Teratozoospermie ( $< 50\%$  normale Morphologie und normale Spermatozoendichte).

### 3.4.            Verwendete Lösungen und Farbstoffe

Im den folgenden Abschnitten werden die für die einzelnen Versuche verwendeten Lösungen und Farbstoffe dargestellt.

#### 3.4.1.           Untersuchungen in nicht kapazitierenden Medien

1. PBS-Puffer            : NaCl 9.0 g  
                               $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  1.62 g  
                               $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,37 g  
                              Die angegebenen Stoffe werden in einem Liter demineralisiertem Wasser gelöst
2. Trypanblau            : 2% Trypanblau (Fa. Sigma, München) in PBS-Puffer
3. Glutaraldehyd        : 3% Glutaraldehyd in PBS-Puffer
4. Bismarkbraun         : 0.8% Bismarkbraun (Firma: Sigma, München) pH 1.8
5. Bengalrosa           : 0.8% Bengalrosa (Firma: Sigma, München) in 0.1 M Tris-Puffer pH 5.3

Der Puffer wurden am Versuchstag fertiggestellt. Ebenso wurde die Trypanblaulösung und die Glutaraldehydlösung am Versuchstag hergestellt.

### 3.4.2. Untersuchungen in kapazitierenden Medien

1. TMPA-Puffer : NaCl 8.0g  
KCl 0.2g  
CaCl x 2 H<sub>2</sub>O 0.26g  
MgCl x 6 H<sub>2</sub>O 0.212g  
NaHCO<sub>3</sub> 3.0g  
Glucose 0.9g  
Die angegebenen Stoffe werden in einem Liter demineralisiertem Wasser gelöst.
2. TMPA-BSA-Medium: dem TMPA-Puffer werden 3mg/ml bovines Serumalbumin zugesetzt.
3. TMPA-HSA-Medium: dem TMPA-Puffer werden 35mg/ml humanes Serumalbumin zugesetzt.
4. Trypanblau : 2% Trypanblau (Fa. Sigma, München) in TMPA-HSA- Medium.
5. Glutaraldehyd : 3% Glutaraldehyd in TMPA-Puffer

Für die Färbung mit Bismarkbraun und Bengalrosa wurden dieselben Lösungen wie unter 3.4.1. verwendet.

Die Puffer wurden am Versuchstag fertiggestellt, so daß keine Konservierungsmittel notwendig waren. Auch wurden die Glutaraldehyd- und die Trypanblaulösungen erst am Versuchstag hergestellt.

### 3.5. Beschreibung des Färbevorgangs

Die Färbung der Spermatozoen erfolgte nach der von Talbot und Chacon 1981 angegebenen "triple-stain"-Technik.

#### 3.5.1. Färbevorgang bei der ersten Patientengruppe (nicht-kapazitierende Medien)

Von dem verflüssigten und durchmischten Ejakulat wurden 200µl abgenommen und 15 Minuten mit 200µl Trypanblau in PBS bei 37°C gefärbt. Danach wurde zweimal mit PBS bei 500g für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgehoben und verworfen das Pellet wurde in PBS resuspendiert. Anschließend an diesen Waschvorgang wurden die Präparate 30 Minuten mit 3% Glutaraldehyd bei 37°C fixiert und nach zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser bei 500g für 8 Minuten auf entfettete Objektträger aufgetragen und an der Luft getrocknet.

Die Färbung mit Bismarkbraun und Bengalrosa konnte nun zu einem beliebigem Zeitpunkt stattfinden.

Die Färbung mit Bismarkbraun wurde im 40° C warmen Wasserbad 5 Minuten lang vorgenommen. Bevor die Präparate in Bengalrosa weiter gefärbt werden können, müssen sie gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen werden. Daran anschließend werden sie für 25-30 Minuten bei Zimmertemperatur in Bengalrosa inkubiert. Auch nach diesem letzten Färbeschritt werden die Präparate gründlich in destilliertem Wasser gewaschen und darüberhinaus noch in einer aufsteigenden Alkoholreihe getrocknet, in Xylol gereinigt und mit einem Deckglas geschützt.

### 3.5.2. Färbevorgang bei der zweiten Patientengruppe und den Polyzoospermiepatienten (kapazitierende Medien)

Ein Milliliter der verflüssigten und durchmischten Ejakulate wurde zunächst zweimal in TMPA-BSA bei 500g 8 Minuten gewaschen, danach wurde es in TMPA-HSA-Medium resuspendiert und in 4 Aliquots von 0.25ml aufgeteilt und in fest verschließbare 0.5ml Plastikreaktionsgefäße abgefüllt, um den Gasaustausch mit der Umgebung und die Eintrocknung zu verhindern. Drei dieser Portionen wurden für die Bestimmung zu den Zeitpunkten 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden bei 37°C im Wasserbad aufbewahrt. Die vierte Portion wurde sofort gefärbt, ebenso wurde sofort die Motilität bestimmt (siehe unter 3.8.). Die Färbung erfolgte wie unter 3.5.1. beschrieben, jedoch wurde Trypanblau in TMPA-HSA und Glutaraldehyd in TMPA verwendet. Außerdem wurde entsprechend statt mit PBS mit TMPA-BSA gewaschen.

### 3.6. Auswertung der gefärbten Ausstrichpräparate

Die Ausstriche wurden bei 1000-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Pro Ausstrich wurden 400 Spermatozoen beurteilt. Die Gesichtsfelder wurden zufällig ausgewählt und alle morphologisch intakten Spermatozoen eines Gesichtsfeldes berücksichtigt.

Dabei wurden die Spermatozoen in die folgenden drei Gruppen unterteilt (siehe auch Abbildung (8)):

#### 1. Lebendige nicht akrosomal reagierte Spermatozoen

Darunter werden alle morphologisch intakten Spermatozoen verstanden, welche ein rosa Akrosom (Bengalrosa) tragen und sich postakrosomal braun (Bismarkbraun) anfärben.

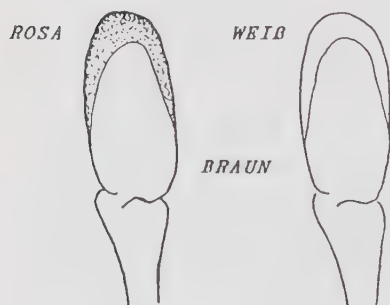
## 2. Lebendige akrosomal reagierte Spermatozoen

Darunter werden alle morphologisch intakten Spermatozoen verstanden, welche im Bereich des Akrosoms entweder weiß sind oder schon eine deutliche Vesikulation zeigen. Der postakrosomale Bereich ist wiederum braun.

## 3. Tote Spermatozoen

Das sind Spermatozoen, die sich im postakrosomalen Bereich blau bis schwarz anfärben. Manche tragen auch eine rosa Restfärbung des Akrosoms als Zeichen, daß sie vor ihrem Absterben noch nicht akrosomal reagiert waren.

VITALE SPERMATOZOEN  
nicht reagiert reagiert



TOTE SPERMATOZOEN  
nicht reagiert reagiert

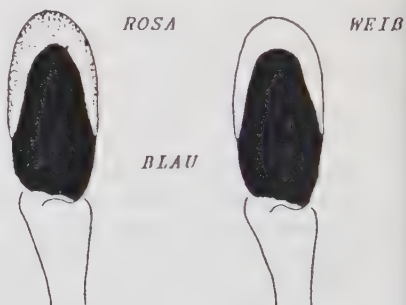


Abbildung 8: Die Abbildung zeigt schematisch die möglichen Befunde bei der Anfärbung nach der "triple-stain"-Technik.

### 3.7. Beurteilung der Färbemethode

Bei der ersten Gruppe von Patienten sollte der Zustand der Spermatozoen nach der Ejakulation möglichst unverfälscht beurteilt werden. Daher wurden die Spermatozoen vor der Färbung mit Trypanblau nicht gewaschen, um nicht das Seminalplasma mit seiner stabilisierende Wirkung auf das Akrosom zu entfernen. Diese Vorgehensweise interferiert jedoch mit der zuverlässigen Anfärbung der toten Spermatozoen in der Trypanblaufärbung. Offenbar haben Faktoren des Seminalplasmas dazu geführt, daß sich die toten Spermatozoen nicht in der Weise anfärben wie dies der Fall ist, wenn gewaschene Spermatozoen verwendet werden. Das Seminalplasma tritt vermutlich in Konkurrenz um den Farbstoff. Dieser Tatsache wurde bei der Auswertung insofern Rechnung getragen, als daß die akrosomlosen Spermatozoen in % der vitalen Spermatozoen angegeben wurden.

Bei der zweiten Patientengruppe und bei den Polyzoospermiepatienten, deren Spermatozoen zweimal vor der Untersuchung mit TMPA-BSA gewaschen wurden, so daß das Seminalplasma entfernt war, trat dieses Problem nicht zu Tage.

Generell gilt, daß sich in der Trypanblaufärbung oft nicht das ganze Spermatozoon, anfärbt sondern vor allem die Halsregion, so daß der Grad der Anfärbung recht variabel ist. Diese Beobachtung haben auch Dudenhausen und Talbot (1982) gemacht, die annehmen, daß der Grad der Anfärbung mit dem Zeitpunkt des Todes zusammenhängt.

In dieser Arbeit wurden daher als vitale Spermatozoen nur solche gezählt, die an keiner Stelle mit Trypanblau angefärbt waren.

Technisch ist das "triple-staining" mit einfachen Mitteln durchzuführen. Das gilt insbesondere im Vergleich zu elektronenoptischen Untersuchungen, aber auch im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie, beides Verfahren, die ebenfalls die Beurteilung des akrosomalen Zustandes zulassen. Mit Hilfe des "triple-stainings" können tote von lebendigen Spermatozoen differenziert werden. Das ist mit den anderen genannten Verfahren nicht möglich.

Ein weiterer positiver Aspekt dieser Technik ist, daß die Beurteilung großer Zahlen von Spermatozoen zulässt.

Angenehm bei der technischen Durchführung ist daß nicht der ganze Färbevorgang zu einer Zeit stattfinden muß, sondern die Anfärbung mit Bismarkbraun und Bengalrosa zu einem beliebigen Zeitpunkt vorgenommen werden kann. Daher ist es möglich, eine große Anzahl von Ejakulaten gleichzeitig zu bearbeiten. Das entspricht den Anforderungen einer andrologischen Sprechstunde, wo in der Regel innerhalb weniger Stunden ein großer Arbeitsanfall entsteht. Nachdem die Präparate auf dem Objektträger fixiert sind, kann die weitere Anfärbung und auch die Auswertung zu einem beliebigen Zeitpunkt stattfinden. Es ist somit unerheblich, ob an einem Tag sehr viele oder weniger Patienten die Sprechstunde aufsuchten.

### 3.8. Motilitätsmessung mit der Dunkelfeldmethode

Die Motilitätsmessungen wurden nach der von Overstreet et.al. (1979) angegebenen Methode vorgenommen, die entsprechend unserer Bedürfnisse modifiziert wurde.

#### 3.8.1. Verwendete Geräte und Materialien

Zur Motilitätsmessung wurden folgende Geräte und Materialien eingesetzt.

1. Mikroskop (Objektiv 10x) mit direkt aufmontierter Kamera. Die Belichtungszeit betrug 1 Sekunde.
2. Beheizter Objektträgertisch (37°C) für das Mikroskop
3. Zählkammer nach Makler (1978) mit einem Messnetz, das aus 10 x 10 Quadraten mit einer Seitenlänge von 100µm

besteht. Die Tiefe der Kammer beträgt  $10\mu\text{m}$ .

4. Schwarz-Weiß-Film (Ilford FP4, 125 ASA)
5. Entfernungsmesser für Landkarten
6. Diaprojektionssystem zur Darstellung und Auswertung des gewonnenen Filmmaterials.

### 3.8.2. Motilitätsmessung

Zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden wurden aus den Plastikreaktionsgefäßen jeweils  $5\mu\text{l}$  der Spermatozoensuspension entnommen und in die Messkammer nach Makler eingebracht. Die Messkammer und der Objekträgereisch des Mikroskops hatten eine Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$ . Je Probe wurden mit der dem Mikroskop aufgeschalteten Kamera zwei Aufnahmen von unterschiedlichen Gesichtsfeldern gemacht nach der von Overstreet et.al. (1979) angegebenen Methode. Die Belichtungszeit betrug eine Sekunde. Dabei wurde die Methode dahingehend modifiziert, daß im Dunkelfeld bei einer geringeren Vergrößerung ein größeres Gesichtsfeld fotografiert wurde und damit mehr Spermatozoen pro Bild ausgewertet werden konnten.

Unbewegliche Spermatozoen stellen sich bei dem Verfahren als kleine Punkte dar. Die Schwänze der immotilen Spermatozoen sind meist nicht zu erkennen.

Die motilen Spermatozoen hinterlassen dagegen eine Spur auf dem Bild, deren Breite von der Amplitude des der Kopfausschläge abhängt und deren Länge ein Maß für die progressive Beweglichkeit in der Belichtungszeit von einer Sekunde ist.

Die Negativfilme wurden in Diarahmen gefaßt auf einem Projektionssystem ausgewertet. Als Bezugsgröße für die Messung des "lateral head displacement" und der progressiven Motilität diente die bekannte Seitenlänge der Netzquadrate in der Mess-

kammer (100 $\mu$ m).

Die Messung der progressiven Motilität wurde auf dem Projektionsschirm mit Hilfe eines Entfernungsmessers für Landkarten vorgenommen und in  $\mu$ m/Sekunde umgerechnet.

### 3.8.3. Motilitätsparameter

Folgende Parameter wurden bei der Motilitätsmessung bestimmt:

1. Vorwärtsbewegliche Spermatozoen in % aller Spermatozoen
2. Spermatozoen mit "whip-lash"-Bewegung in % der vorwärtsbeweglichen Spermatozoen. Als "whip-lash"-oder hyperaktivierte Motilität wurden alle Spermatozoenbahnen gewertet, die einen lateralen Kopfausschlag von  $\geq 10\mu$ m hatten (Aitken et.al., 1983)
3. Messung der mittleren Geschwindigkeit pro Spermatozoon bei den vorwärtsbeweglichen Spermatozoen.

### 3.9. Beurteilung der Motilitätsmessmethode

Die photomikrographische Motilitätsmessung, so wie sie für diese Arbeit modifiziert und angewendet wurde, lässt die Messung der Motilität an einer großen Zahl von Spermatozoen zu.

Ein Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, daß unter Umständen unbewegliche Spermatozoen nur schwer von Verunreinigungen unterschieden werden können, da sich beide als Punkte darstellen können. Form und Größe dieser Punkte ermöglichen aber in aller Regel, Verunreinigungen von toten Spermatozoen zu unterscheiden.

#### 4. ERGEBNISSE

##### 4.1. Untersuchungen an Spermatozoen in nicht-kapazitierendem Medium

###### 4.1.1. Patientengruppe

Bei einer Gruppe von 89 Patienten wurden die Ejakulate nach dem "triple-stain"-Verfahren angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Es wurden keine kapazitierenden Medien verwendet, vielmehr wurden die Spermatozoen im Seminalplasma belassen (siehe 3.5.1.).

Nach den im andrologischen Routinelabor erhobenen Befunden wurden die Patienten in die folgenden Diagnosegruppen eingeteilt:

Normozoospermie (n=37), Asthenozoospermie (n=26), Oligozoospermie (n=15) und Teratozoospermie (n=11). Für die im Routinelabor erhobenen Werte siehe Tabelle (1)

###### 4.1.2. Ergebnisse der Anfärbung nach dem "triple-stain"-Verfahren

Die Histogramme (Abbildungen 9 bis 12) zeigen links die Häufigkeitsverteilung der am Akrosom nicht reagierten vitalen Spermatozoen und rechts die Häufigkeitsverteilung für akrosomlose vitalen Spermatozoen. In allen Histogrammen zeigt sich, daß die Werte asymmetrisch verteilt sind. In allen Gruppen sind die Spermatozoen zu 80-90% akrosomintakt.

|                                         | Normozoo-<br>spermien<br>(n=7) | Oligozoo-<br>spermien<br>(n=6) | Asthenozoo-<br>spermien<br>(n=7) | Teratozoo-<br>spermien<br>(n=4) |
|-----------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Spermatozoen-<br>dichte<br>(Mio/ml)     | 84 $\pm$ 36                    | 13 $\pm$ 4                     | 73 $\pm$ 57                      | 56 $\pm$ 24                     |
| pathologische<br>Spermatozoen<br>(in %) | 34 $\pm$ 10                    | 55 $\pm$ 11                    | 49 $\pm$ 15                      | 59 $\pm$ 6                      |
| motile<br>Spermatozoen<br>(in %)        | 54 $\pm$ 5                     | 43 $\pm$ 10                    | 47 $\pm$ 16                      | 56 $\pm$ 24                     |
| progr. motile<br>Spermatozoen<br>(in %) | 30 $\pm$ 14                    | 20 $\pm$ 14                    | 15 $\pm$ 8                       | 22 $\pm$ 8                      |

Tabelle 1: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen für die Routinelaborbefunde bei den Untersuchungen in nicht kapazitierenden Medien.

Die asymmetrische Verteilung ist für alle Gruppen ähnlich. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde jeweils der Medianwert und der Interquartilbereich, d.h. der Bereich innerhalb der asymmetrischen Verteilung, in welchem 75% der Werte liegen, ermittelt.

Die Boxplots der Abbildung (13) zeigen für die jeweilige Diagnosegruppe den höchsten und den niedrigsten Wert der erhobenen Befunde. Der Interquartilbereich ist als Kasten besonders gekennzeichnet. Innerhalb des Interquartilbereiches ist der Medianwert als gestrichelte Linie angegeben. Wie Abbildung (13) zeigt überlappen sich die Interquartilbereiche weit. Das bedeutet, daß sich die Gruppen Normozoospermie, Oligozoospermie, Teratozoospermie und Asthenozoospermie in

# NORMOZOOSPERMIEN

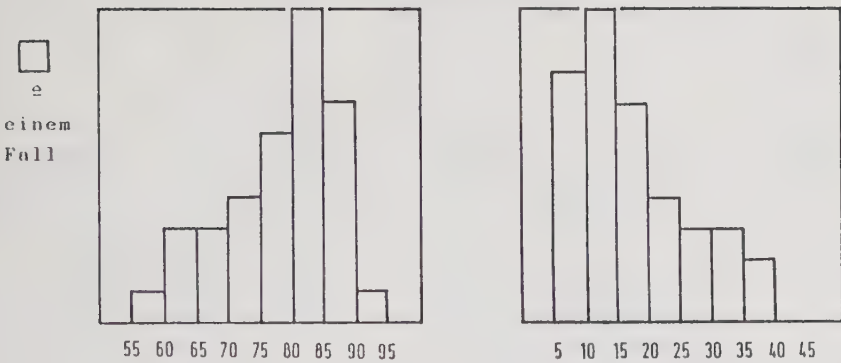


Abbildung 9 (Histogramm): Die Häufigkeitsverteilungen des Befundes akrosomintakter Spermatozoen (links) und akrosomloser Spermatozoen (rechts) bei den Normozoospermiepatienten.

# OLIGOZOOSPERMIEN

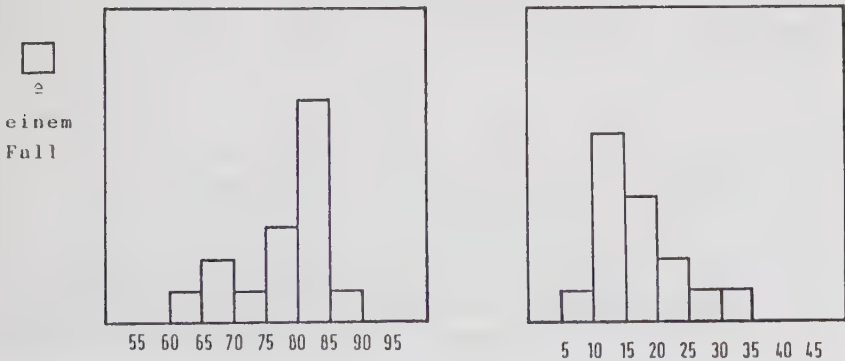


Abbildung 10 (Histogramm): Die Häufigkeitsverteilung des Befundes akrosomintakter Spermatozoen (links) und akrosomloser Spermatozoen (rechts) bei den Oligozoospermiepatienten.

# ASTHENOZOOSPERMIEN

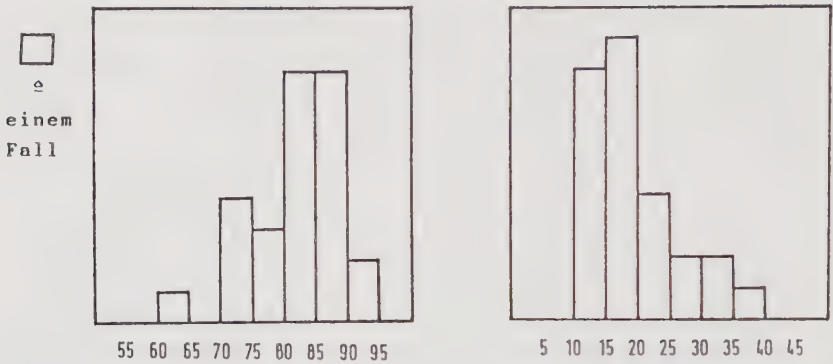


Abbildung 11 (Histogramm): Die Häufigkeitsverteilung des Befundes akrosomintakter Spermatozoen (links) und akrosomloser Spermatozoen (rechts) bei den Asthenozoospermiepatienten.

# TERATOZOOSPERMIEN

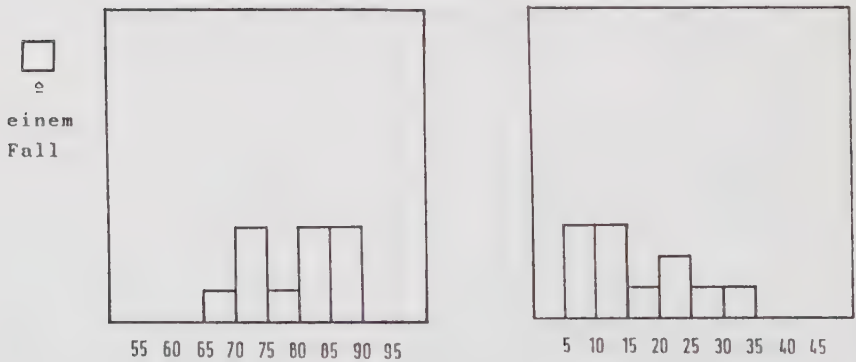


Abbildung 12 (Histogramm): Die Häufigkeitsverteilung des Befundes akrosomintakter Spermatozoen (links) und akrosomloser Spermatozoen (rechts) bei den Teratozoospermiepatienten.

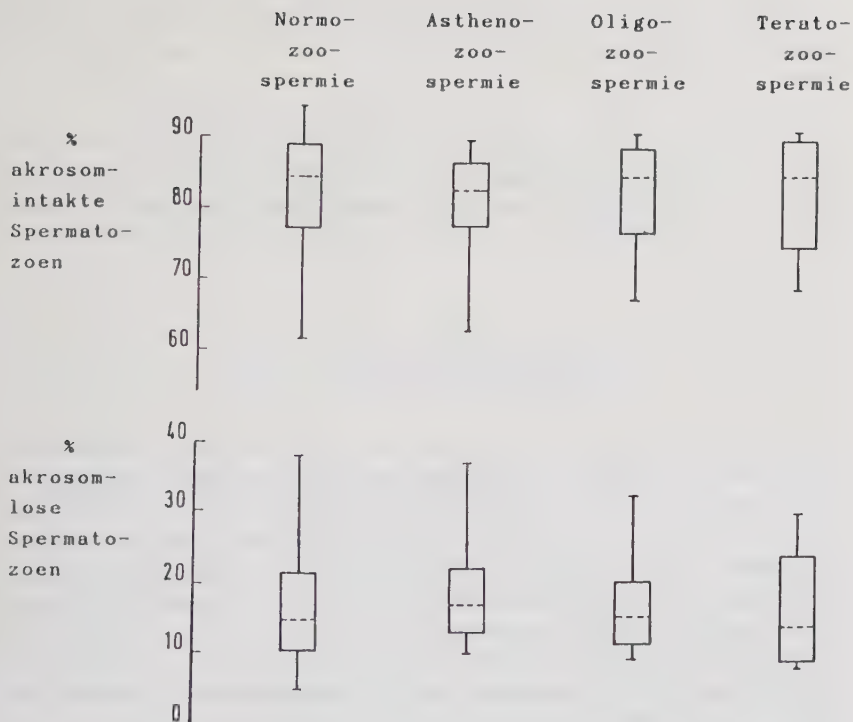


Abbildung 13 (Boxplots): Darstellung des jeweils höchsten und niedrigsten Wertes, des Interquartilbereiches (Kasten) und des Medianwertes (gestrichelte Linie) für die angegebenen Diagnosegruppen. Oben sind die Werte für die akrosomenintakten und unten für die akrosomloser Spermatozoen aufgetragen.

Bezug auf das Merkmal Akrosomverlust zum gemessenen Zeitpunkt und unter den gegebenen Bedingungen nicht unterschiedlich verhalten.

Der Medianwert für die Normozoospermien liegt bei  $\tilde{x} = 15,0\%$

akrosomloser Spermatozoen, für die Gruppe der Oligozoospermien liegt der entsprechende Wert bei  $\tilde{X} = 15,5\%$ , für die Asthenozoospermien bei  $\tilde{X} = 17.0\%$  und bei den Teratozoospermien bei  $\tilde{X} = 14\%$ .

#### 4.2. Untersuchungen an Spermatozoen in kapazitierenden Medien

##### 4.2.1. Patientengruppe

Bei einer Gruppe von 31 Patienten wurde zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden eine Kinetik der Akrosomreaktion mit Hilfe der "triple-stain"-Technik erstellt. Diese 31 Patienten teilten sich nach den Ergebnissen des andrologischen Routinelabors auf in 7 Normozoospermien, 6 Oligozoospermien, 7 Asthenozoospermien, 4 Teratozoospermien und weitere 7 Polyzoospermien.

Neben der Akrosomreaktion wurden für die untersuchten Patienten mit Ausnahme der Polyzoospermien auch die Motilitätsparameter bestimmt (siehe 3.8.2.).

Für die im andrologischen Routinelabor erhobenen Befunde siehe Tabelle (2).

#### 4.2.2. Ergebnisse der Anfärbung nach dem "triple-stain"-Verfahren

Die Einzelbefunde des "triple-stainings" sind für die untersuchten Patienten sind zusammen mit den Befunden der Motilitätsmessung in Tabelle (3) aufgelistet. Daneben wurden wie in den folgenden Abschnitten geschildert die Befunde auch graphisch dargestellt.

##### 4.2.2.1. Graphische Darstellung der Befunde

###### 4.2.2.1.1. Normozoospermiegruppe

Die Ergebnisse der "triple-stain"-Färbung sind in der Abbildung (14 A) als akrosomal reagierte Spermatozoen in % aller morphologisch intakter toter und lebendiger Spermatozoen dargestellt; in Abbildung (14 B) sind die akrosomal reagierten Spermatozoen in % der vitalen Spermatozoen dargestellt.

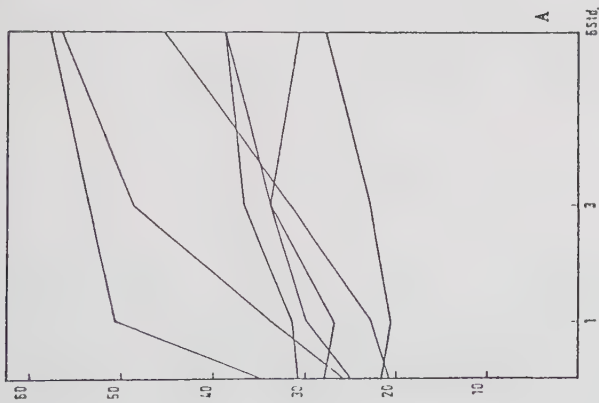
In der Beschriftung der Abbildung sind die Kennnummern der Patienten in der Reihenfolge aufgelistet wie sie von oben nach unten am rechten Bildrand auftreten. Das gilt auch für die Abbildungen (15), (16), (17) und (18).

Zwischen 0 Stunden und 1 Stunde nimmt bei allen Patienten die Zahl der akrosomenreagierten Spermatozoen zu, bis auf eine Ausnahme den Patienten 1940/83. Zwischen 1 Stunde und 3 Stunden bzw. zwischen 3 Stunden und 6 Stunden kommt es ausnahmslos zu einem Anstieg der Akrosomenreaktion. Dabei ist die Steigung der Kurven jedoch recht unterschiedlich. Bei den Patienten 1940/83, 2060/83, 2080/83 und 2400/83 flacht sich die Kurve im Gegensatz zu den Patienten 2401/83, 2001/83 und 2018/83 auch gegen Ende der Beobachtungszeit nicht ab.

|                                          | Normozoo-<br>spermien<br>(n=7) | Oligozoo-<br>spermien<br>(n=6) | Asthenozoo-<br>spermien<br>(n=7) | Teratozoo-<br>spermien<br>(n=4) | Polyzoo-<br>spermien<br>(n=7) |
|------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Spermato-<br>zoen-<br>dichte<br>(Mio/ml) | 128 ± 89                       | 13 ± 5                         | 96 ± 36                          | 77 ± 64                         | 306 ± 219                     |
| patolog.                                 |                                |                                |                                  |                                 |                               |
| Spermato-<br>zoen<br>(in %)              | 36 ± 5                         | 51 ± 19                        | 49 ± 16                          | 63 ± 5                          | 48 ± 13                       |
| motile                                   |                                |                                |                                  |                                 |                               |
| Spermato-<br>zoen<br>(in %)              | 52 ± 4                         | 50 ± 6                         | 40 ± 5                           | 50 ± 0                          | 39 ± 8                        |
| progr.mot.                               |                                |                                |                                  |                                 |                               |
| Spermato-<br>zoen<br>(in %)              | 32 ± 4                         | 29 ± 7                         | 15 ± 10                          | 26 ± 5                          | 17 ± 11                       |

Tabelle 2 : Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen für die Routinelaborbefunde bei den Untersuchungen in kapazitierenden Medien.

akrosomal  
reagierte  
Spermato-  
zoen  
in %  
aller  
Spermato-  
zoen



akrosomal  
reagierte  
Spermato-  
zoen  
in % der  
vitalen  
Spermato-  
zoen

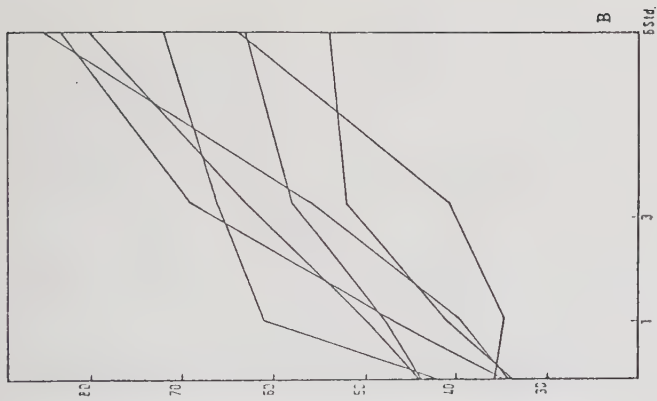


Abbildung 14: Verlauf der Akrosomreaktion bei Normozoospermiepatienten. Patienten-  
tenkennnummern in der Reihenfolge der Kurven von oben nach unten zur  
Zeit  $t = 6h$  (Untersuchte Patienten:  $n=7$ ).

A: 2401/83, 2400/83, 2080/83, 2060/83, 2001/83, 2018/83, 1940/83

B: 2080/83, 2400/83, 2060/83, 2401/83, 1940/83, 2001/83, 2018/83

#### 4.2.2.1.2. Oligozoospermiegruppe

Die Ergebnisse der Untersuchungen bei Patienten, die an Oligozoospermie leiden, gehen aus Abbildung (15) hervor. Abbildung (15 A) zeigt die akrosomal reagierten Spermatozoen in % aller toten und lebendigen Spermatozoen, Abbildung (15 B) zeigt die akrosomal reagieren Spermatozoen in % der vitalen Spermatozoen. In der Regel ist der Verlauf der Kurven in beiden Darstellungsweisen ähnlich, es gibt jedoch Ausnahmen. Fall 1938/83 zeigt in Abbildung (15 A) einen scheinbar geringen dynamischen Verlauf, in Abbildung (15 B) zeigt sich jedoch, daß nach Bereinigung der toten Spermatozoen die verbliebenen vitalen Spermatozoen eine starke Akrosomreaktion aufweisen.

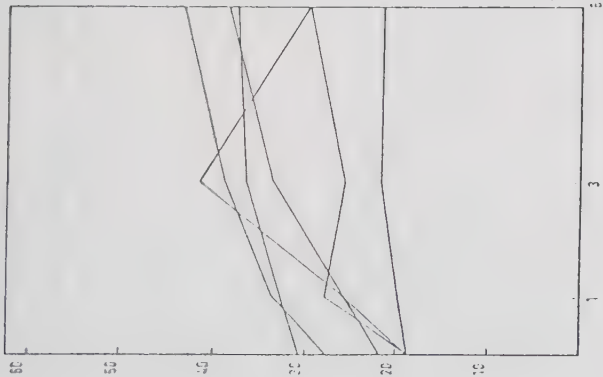
Patient 2031/83 hebt sich von den übrigen Patienten dadurch ab, daß die Zahl der akrosomal reagierten Spermatozoen jenseits des 3 Stunden Wertes wieder abnimmt, also offenbar mehr akrosomenreagierte Spermatozoen absterben als aus dem Pool der vitalen Spermatozoen hinzukommen.

Die Steigung der Kurven ist während der ersten 3 Stunden am steilsten, danach verringert sich die Steigung der Kurven.

#### 4.2.2.1.3. Asthenozoospermiegruppe

Abbildung (16 A) ist die Darstellung der akrosomal reagierten in % aller toten und lebendigen Spermatozoen. Abbildung (16 B) zeigt die Akrosomreaktion in % der vitalen Spermatozoen. Auch hier ist die Steigung der Kurven innerhalb der ersten 3 Stunden am stärksten, was sich insbesondere in der Darstellungsweise der Abbildung (16 B) zeigt. Eine Ausnahme bildet Patient 2084/83, da sich bei ihm die Dynamik der Akrosomreaktion zwischen der 3. und der 6. Stunde nochmals verstärkt. Auch die Patienten 2017/83 und 2426/83 fallen im

akrosomal  
reagierte  
Spermato-  
zoen  
in %  
aller  
Spermato-  
zoen



akrosomal  
reagierte  
Spermato-  
zoen  
in % der  
vitalen-  
Spermato-  
zoen

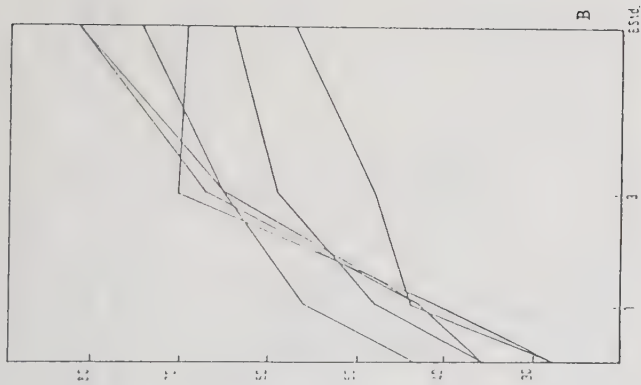
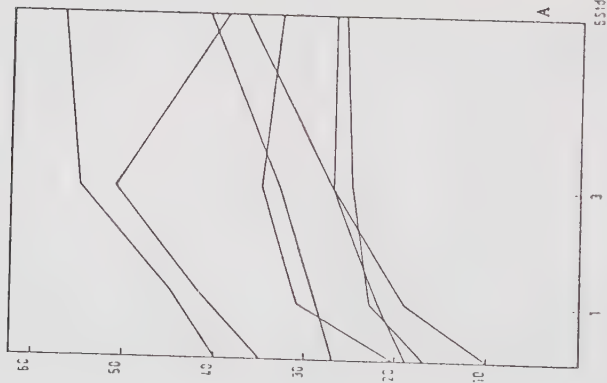


Abbildung 15: Verlauf der Akrosomreaktion bei Oligozoospermiepatienten. Patientenkennummern in der Reihenfolge der Kurven von oben nach unten zur Zeit  $t = 6h$  (Untersuchte Patienten:  $n=6$ ).

A: 2062/83, p773/83, 2081/83, 2031/83, 2020/83, 1938/83

B: 2081/83, 1938/83, p773/83, 2031/83, 2062/83, 2020/83

akrosomal  
reagierte  
Spermato-  
zoen  
in %  
aller  
Spermato-  
zoen



akrosomal  
reagierte-  
Spermato-  
zoen  
in % der  
vitalen  
Spermato-  
zoen

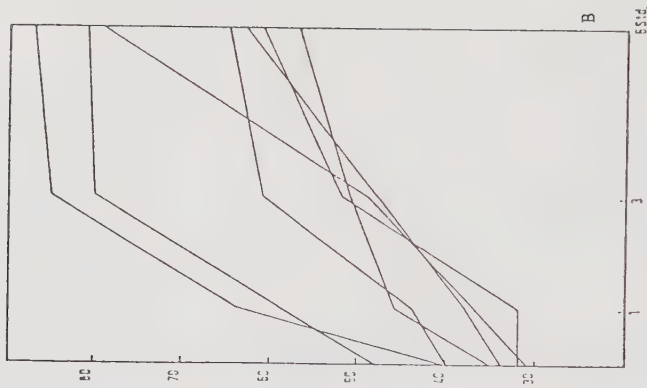


Abbildung 16: Verlauf der Akrosomreaktion bei Asthenozoospermiepatienten. Patientenkennnummern in der Reihenfolge der Kurven von oben nach unten zur Zeit  $t = 6h$  (Untersuchte Patienten:  $n=7$ ).

A: 2017/83, 1998/83, 2426/83, 2084/83, 261/83, 1996/83, 1997/83

B: 2017/83, 2426/83, 2084/83, 261/83, 1998/83, 1996/83, 1997/83

Vergleich zu den anderen Patienten durch ihre außerordentliche Dynamik auf. Insbesondere gilt das für die Darstellung in Abbildung (16 B).

#### 4.2.2.1.4. Teratozoospermiegruppe

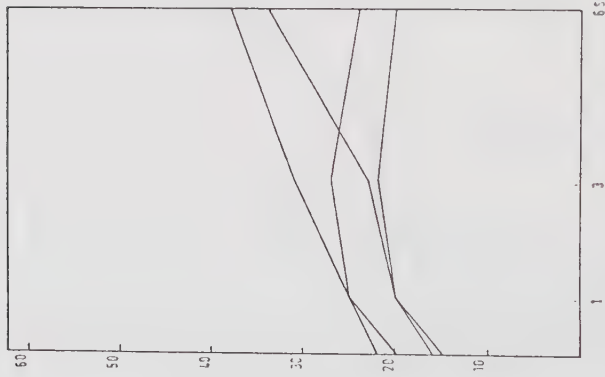
Auch hier wurde die Zahl der akrosomal reagierten Spermatozoen in Bezug auf alle toten und lebendigen Spermatozoen (Abbildung 17 A) oder in Bezug auf vitale Spermatozoen (Abbildung 17 B) angegeben.

Auch in dieser Diagnosegruppe liegt der Bereich der steilsten Steigung der Kurven innerhalb der ersten 3 Stunden mit der Ausnahme des Patienten 1991/83, bei dem das Maximum der Steigung erst zwischen der 3. und der 6. Stunde erreicht wird. Bemerkenswert erscheint auch Patient 2428/83, dessen Akrosomreaktion nur einen geringen Anstieg über die Zeit verzeichnet.

#### 4.2.2.1.5. Polyzoospermiegruppe

Abbildung (18 A) zeigt die Akrosomreaktion in % aller toten und lebendigen Spermatozoen; Abbildung 18 B ist die Darstellung der akrosomal reagierten Spermatozoen in % der vitalen Spermatozoen. Mit Ausnahme des Patienten 257/84, der innerhalb der ersten Stunde in der Darstellungsweise der Abbildung 18 B eine stärkere Dynamik zeigt, gilt für alle Patienten, daß die Akrosomreaktion auf einem niedrigen Niveau und mit geringer Dynamik verläuft.

akrosomal  
reagierte  
Spermato-  
zoen  
in %  
aller  
Spermato-  
zoen



akrosomal  
reagierte  
Spermato-  
zoen  
in % der  
vitalen  
Spermato-  
zoen

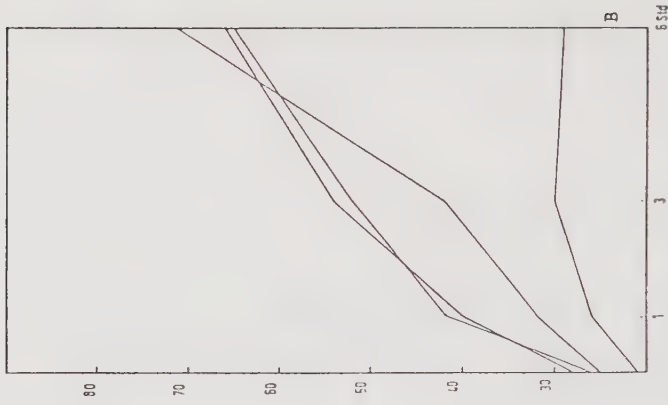
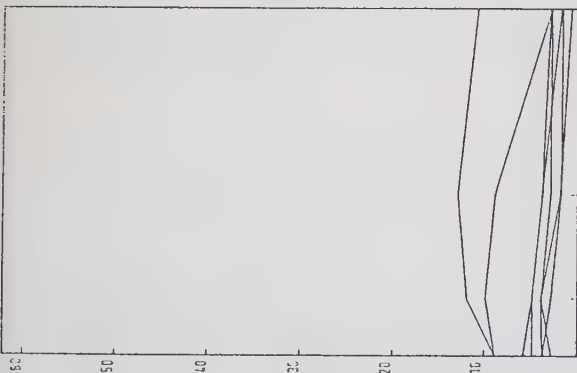


Abbildung 17: Verlauf der Akrosomreaktion bei Teratozoospermiepatienten. Patientenkennnummern in der Reihenfolge der Kurven von oben nach unten zur Zeit  $t = 6h$  (Untersuchte Patienten:  $n=4$ ).

A: 2016/83, 1991/83, 1936/83, 2428/83  
B: 1991/83, 2016/83, 1936/83, 2428/83

akrosomal  
reagierte  
Spermato-  
zoen  
in %  
aller  
Spermato-  
zoen



akrosomal  
reagierte  
Spermato-  
zoen  
in % der  
vitalen  
Spermato-  
zoen

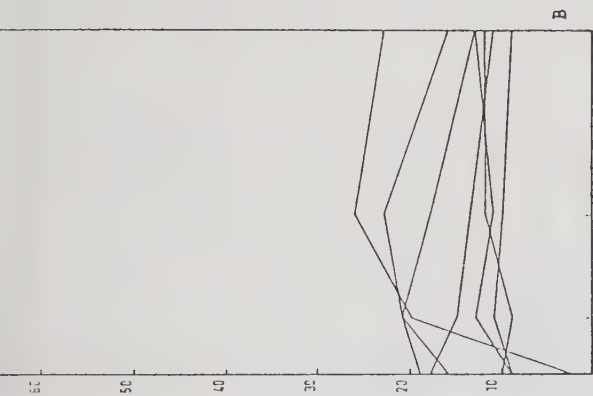


Abbildung 18: Verlauf der Akrosomreaktion bei Polyzospermiepatienten. Patientennummern in der Reihenfolge der Kurven von oben nach unten zur Zeit  $t = 6h$  (Untersuchte Patienten:  $n=7$ ).

A: 267/84, 209/84, 114/84, 208/84, 123/84, 164/84, 165/84

B: 267/84, 209/84, 165/84, 114/84, 123/84, 164/84, 208/84

#### 4.2.2.1.6. Darstellung der Medianwerte und Interquartilbereiche der einzelnen Diagnosegruppen im Vergleich

Bei der Akrosomreaktion handelt es sich um ein Merkmal, das in einer assymetrischen Verteilung vorliegt (siehe auch 4.1.2.). Deshalb wurden für die einzelnen Diagnosegruppen die Medianwerte als Maß für die zentrale Tendenz und die Interquartilbereiche festgestellt und angegeben.

Abbildung (19 A) zeigt die Medianwerte und Interquartilbereiche der Diagnosegruppen als % akrosomenreagierter Spermatozoen von allen toten und lebendigen Spermatozoen, Abbildung (19 B) gibt die entsprechenden Werte bezogen auf vitale Spermatozoen an.

Für beide Darstellungsweisen ergeben sich ähnliche Kurvenverläufe für die Gruppen der Normo-, Oligo-, Terato- und Asthenozoospermie.

Ganz anders verhalten sich die Werte der Polyzoospermiepatienten, die deutlich unter den Werten aller anderen Gruppen liegen. Sogar die Interquartilbereiche bei den Werten der Polyzoospermien liegen deutlich unterhalb der entsprechenden Werte für die anderen Diagnosegruppen.

#### 4.2.2.1.7. Gemeinsame Darstellung der Einzelbefunde

In den Abbildungen (20 A) und (20 B) sind alle Einzelergebnisse des "triple-stainings" gemeinsam, also nicht nach Diagnosegruppen, geordnet dargestellt. Damit soll ein Vergleich aller Werte ermöglicht werden. Die offenbar pathologischen Werte der Polyzoospermien sind nicht aufgeführt. Außerdem wurden in den Abbildungen nur die Kurven mit den Patientenkennummern versehen, die unter 5.4.4. diskutiert werden.

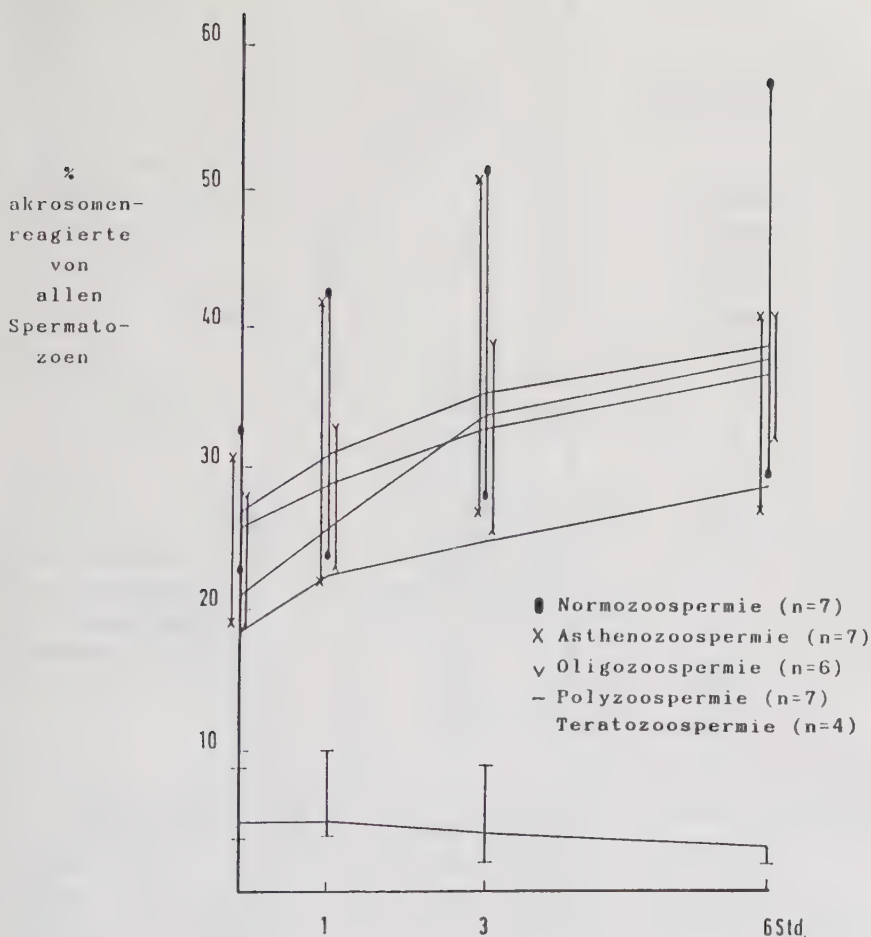


Abbildung 19 A: Medianwerte und Interquartilbereiche für die akrosomenreagierten Spermatozoen in % aller Spermatozoen bei den Diagnosegruppen Normo-, Oligo-, Astheno-, Terato- und Polyzoospermien (die Reihenfolge entspricht der Reihenfolge der Kurven von oben nach unten zur Zeit  $t = 6h$ ).

%  
akrosomen-  
reagierte  
von den  
vitalen  
Spermato-  
zoen

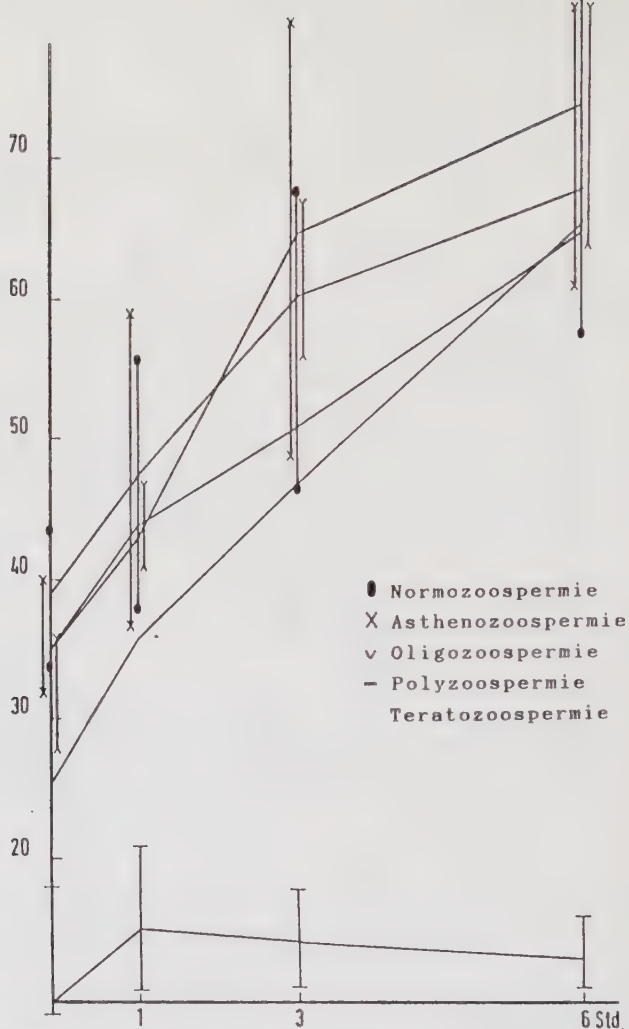


Abbildung 19 B: Medianwerte und Interquartilbereiche für die akrosomenreagierten Spermatozoen in % aller vitaler Spermatozoen bei den Diagnosegruppen Oligo-, Normo-, Terato-, Astheno-, Polyzoospermie (die Reihenfolge entspricht der Reihenfolge der Kurven von oben nach unten zur Zeit  $t = 6h$ ).

| Zeit                                                                        | Medianwert | Obergrenze des<br>Interquartil-<br>bereichs | Untergrenze des<br>Interquartil-<br>bereichs |  |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|--|
| Normozoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller Spermatozoen):         |            |                                             |                                              |  |
| 0h                                                                          | 27         | 24                                          | 33                                           |  |
| 1h                                                                          | 31         | 24                                          | 43                                           |  |
| 3h                                                                          | 36         | 29                                          | 52                                           |  |
| 6h                                                                          | 39         | 30                                          | 58                                           |  |
| Normozoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller vitalen Spermatozoen): |            |                                             |                                              |  |
| 0h                                                                          | 39         | 34                                          | 44                                           |  |
| 1h                                                                          | 48         | 38                                          | 56                                           |  |
| 3h                                                                          | 61         | 47                                          | 68                                           |  |
| 6h                                                                          | 68         | 59                                          | 82                                           |  |
| Oligozoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller Spermatozoen):         |            |                                             |                                              |  |
| 0h                                                                          | 21         | 19                                          | 28                                           |  |
| 1h                                                                          | 26         | 23                                          | 33                                           |  |
| 3h                                                                          | 34         | 26                                          | 39                                           |  |
| 6h                                                                          | 38         | 30                                          | 41                                           |  |
| Oligozoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller vitalen Spermatozoen): |            |                                             |                                              |  |
| 0h                                                                          | 35         | 28                                          | 36                                           |  |
| 1h                                                                          | 43         | 41                                          | 47                                           |  |
| 3h                                                                          | 65         | 56                                          | 67                                           |  |
| 6h                                                                          | 74         | 64                                          | 81                                           |  |
| Asthenozoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller Spermatozoen):       |            |                                             |                                              |  |
| 0h                                                                          | 26         | 19                                          | 31                                           |  |
| 1h                                                                          | 29         | 22                                          | 42                                           |  |
| 3h                                                                          | 33         | 27                                          | 51                                           |  |
| 6h                                                                          | 37         | 27                                          | 41                                           |  |

Asthenozoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller vitalen Spermatozoen):

|    |    |    |    |
|----|----|----|----|
| 0h | 35 | 32 | 40 |
| 1h | 44 | 37 | 59 |
| 3h | 51 | 49 | 80 |
| 6h | 65 | 61 | 81 |

Polyzoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller Spermatozoen):

|    |   |   |    |
|----|---|---|----|
| 0h | 5 | 4 | 9  |
| 1h | 5 | 4 | 10 |
| 3h | 4 | 2 | 9  |
| 6h | 3 | 2 | 3  |

Polyzoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller vitalen Spermatozoen):

|    |    |    |    |
|----|----|----|----|
| 0h | 10 | 9  | 18 |
| 1h | 15 | 11 | 21 |
| 3h | 14 | 11 | 18 |
| 6h | 13 | 11 | 16 |

Teratozoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller Spermatozoen):

|    |    |
|----|----|
| 0h | 19 |
| 1h | 23 |
| 3h | 25 |
| 6h | 29 |

Teratozoospermie (Akrosomlose Spermatozoen in % aller vitalen Spermatozoen):

|    |    |
|----|----|
| 0h | 26 |
| 1h | 36 |
| 3h | 47 |
| 6h | 66 |

Tabelle 2a: Darstellung der Medianwerte und Interquartilbereiche für die untersuchten Diagnosegruppen.

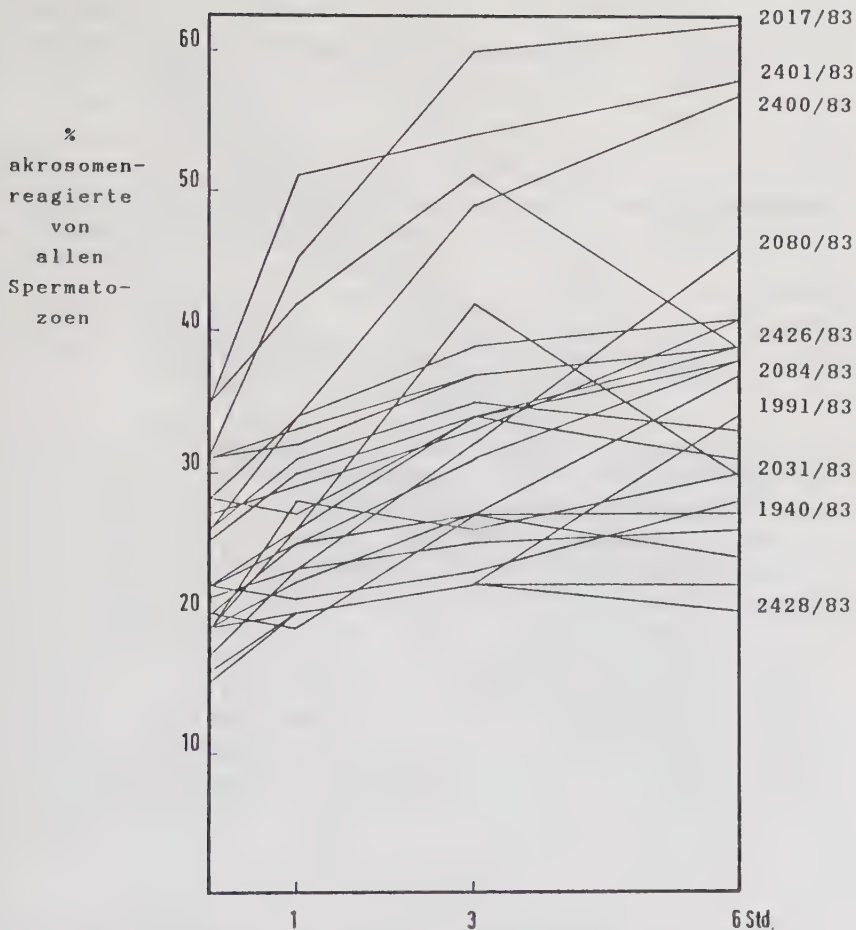


Abbildung 20 A: Darstellung aller Einzelkinetiken als % akrosomenreagierter Spermatozoen von allen Spermatozoen mit Ausnahme der Polyzospermiepatienten. Die unter 5.4.4. diskutierten Kurvenverläufe sind mit Patientenkennummern bezeichnet.

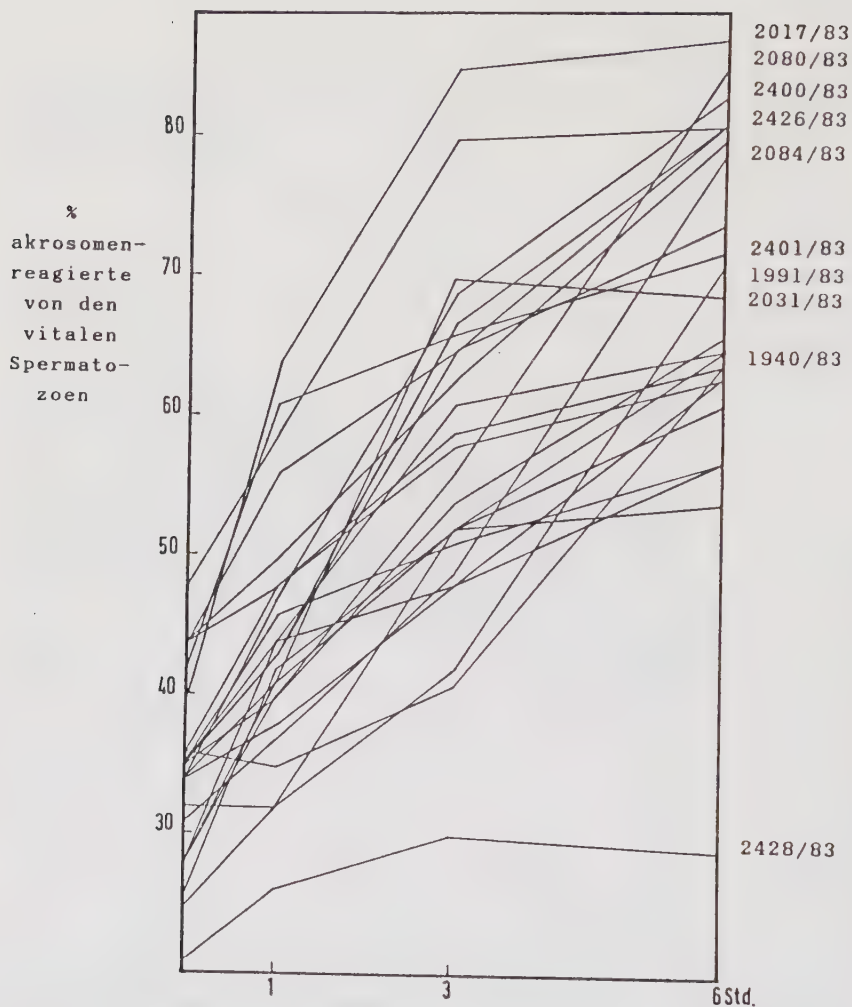


Abbildung 20 B: Darstellung aller Einzelkinetiken als % akrosomenreagierter Spermatozoen von den vitalen Spermatozoen mit Ausnahme der Polyzoospermiepatienten. Die unter 5.4.4. diskutierten Kurvenverläufe sind mit Patientenkennummern bezeichnet.

#### 4.2.3. Ergebnisse der Motilitätsmessungen nach der fotomikrographischen Dunkelfeldmethode

Die Einzelbefunde für die untersuchten Patienten sind in Tabelle (3) aufgeführt. Für die Polyzoospermiepatienten liegen keine Motilitätsparameter vor

##### 4.2.3.1. Graphische Darstellung der Einzelbefunde

Die Motilitätsparameter der einzelnen Patienten sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Der linke Kasten zeigt den %-Anteil motiler Spermatozoen von allen Spermatozoen und den %-Anteil der Spermatozoen, die "whip-lash" Bewegungen ausführen bezogen auf die motilen Zellen (siehe auch die Legende). Der rechte Kasten stellt die durchschnittliche Spermatozoengeschwindigkeit dar.

In Abbildung 21 bis 27 sind die Befunde der Normozoospermiepatienten, in Abbildung 28 bis 34 sind die Befunde der Asthenozoospermiepatienten, in Abbildung 35 bis 40 sind die Befunde der Oligozoospermiepatienten und in Abbildung 41 bis 44 sind die Befunde der Teratozoospermiepatienten dargestellt.

##### LEGENDE zu den Abbildungen 21 bis 44



motile Spermatozoen



hyperaktivierte Spermatozoen

#### 4.2.3.2. Graphische Darstellung der arithmetischen Mittelwerte und Standartabweichungen

In Abbildung (45) werden für die einzelnen Diagnosegruppen die arithmetischen Mittelwerte und die Standartabweichungen der motilen Samenzellen in % aller Spermatozoen angegeben.

Abbildung (46) stellt diese Werte für die hyperaktivierten Zellen in % der motilen Spermatozoen dar.

Die arithmetischen Mittelwerte und Standartabweichungen für die durchschnittliche Spermatozoengeschwindigkeit sind in Abbildung (47) aufgeführt.

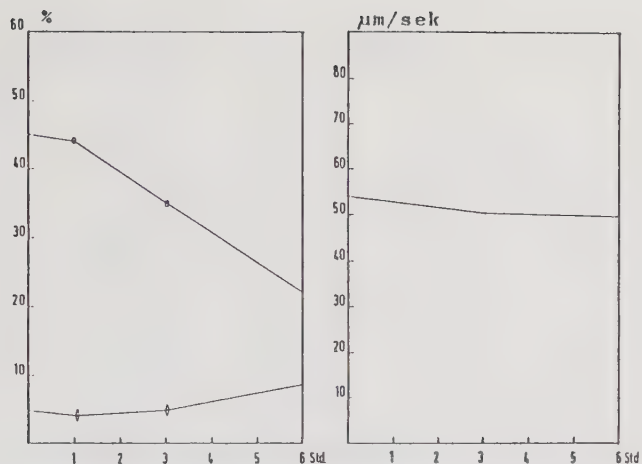


Abbildung 21: Patient 1940/83 (Normozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

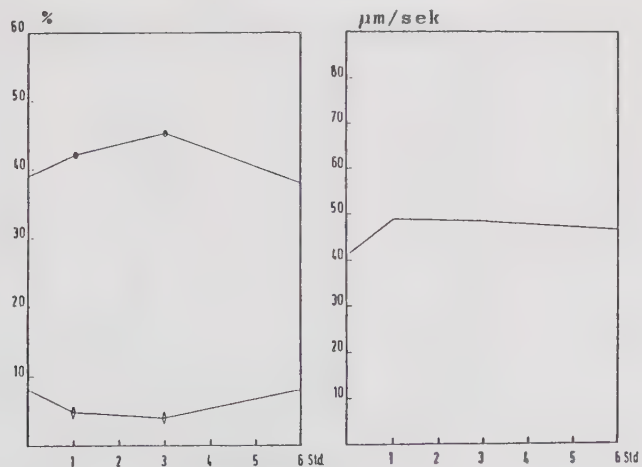


Abbildung 22: Patient 2001/83 (Normozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

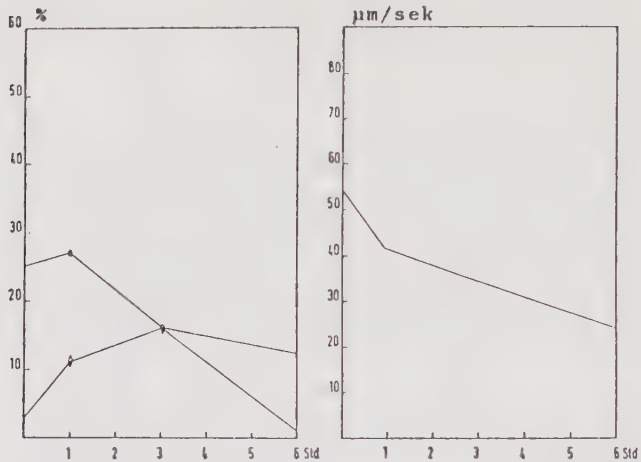


Abbildung 23: Patient 2018/83 (Normozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

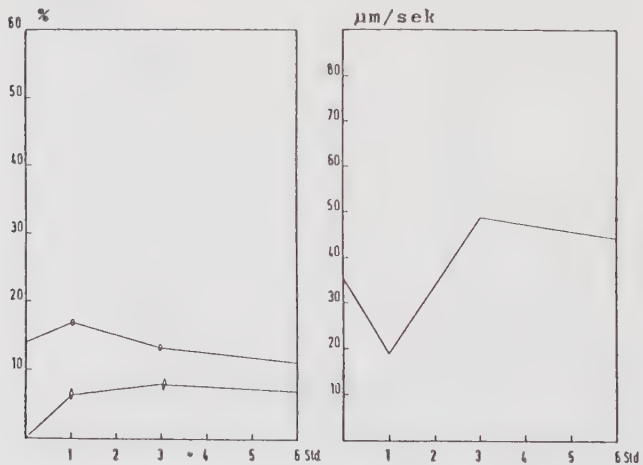


Abbildung 24: Patient 2060/83 (Normozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65

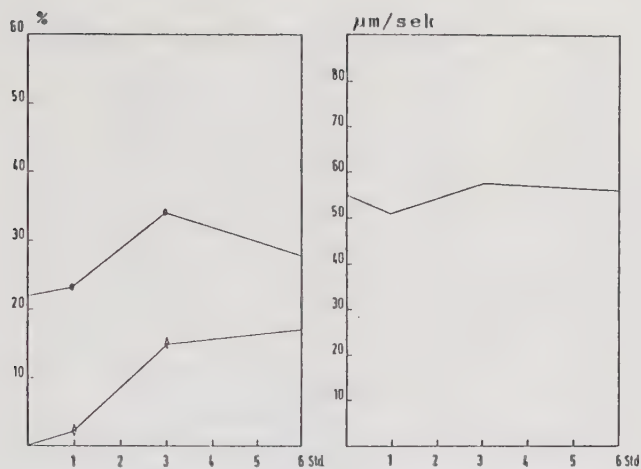


Abbildung 25: Patient 2080/83 (Normozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

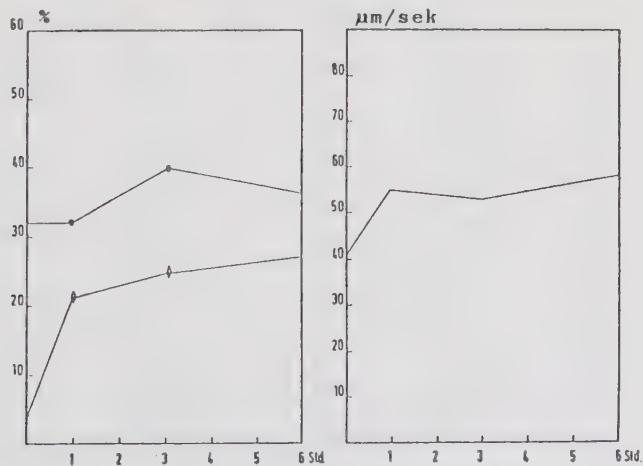


Abbildung 26: Patient 2400/83 (Normozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

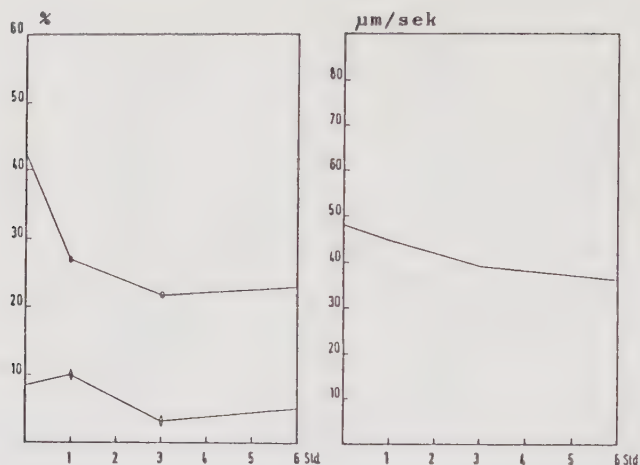


Abbildung 27: Patient 2401/83 (Normozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

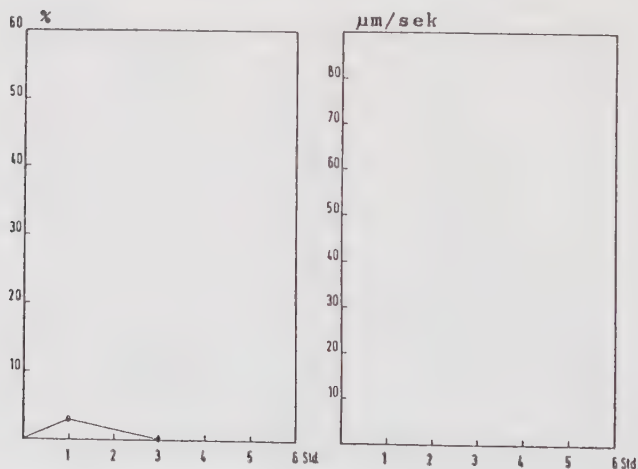


Abbildung 28: Patient 1996/83 (Asthenozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

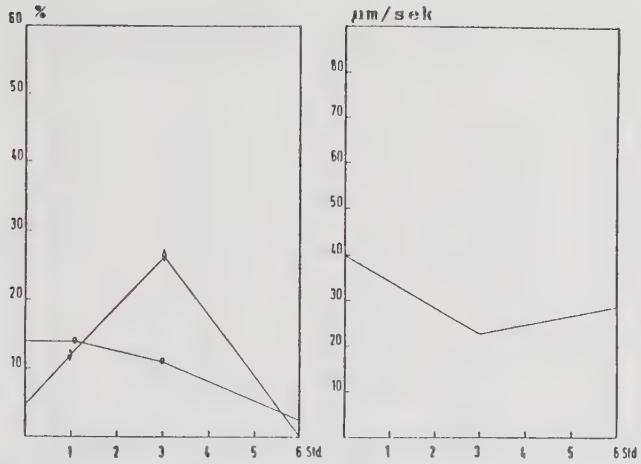


Abbildung 29: Patient 1997/83 (Asthenozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

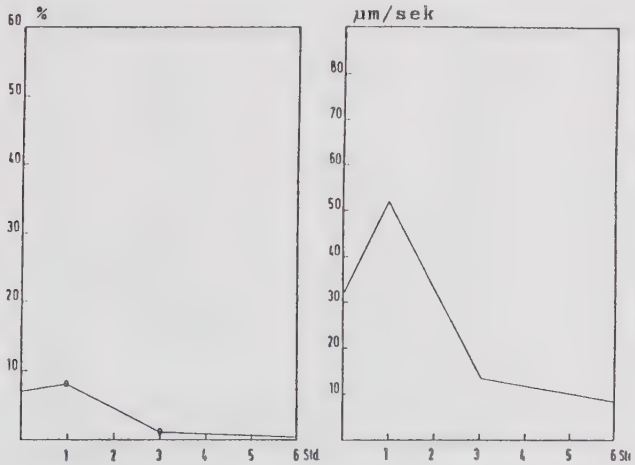


Abbildung 30: Patient 1998/83 (Asthenozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

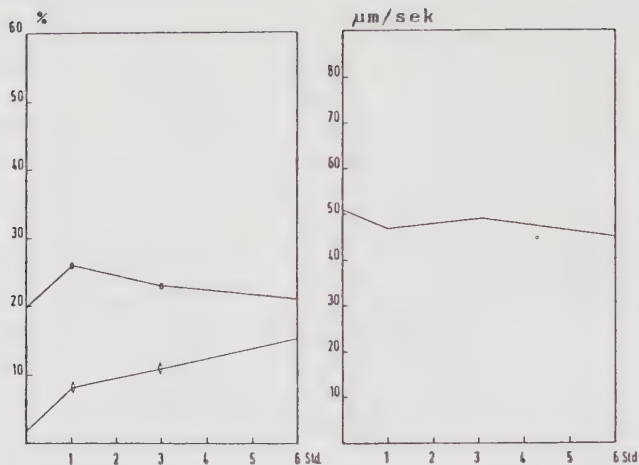


Abbildung 31: Patient 2017/83 (Asthenozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

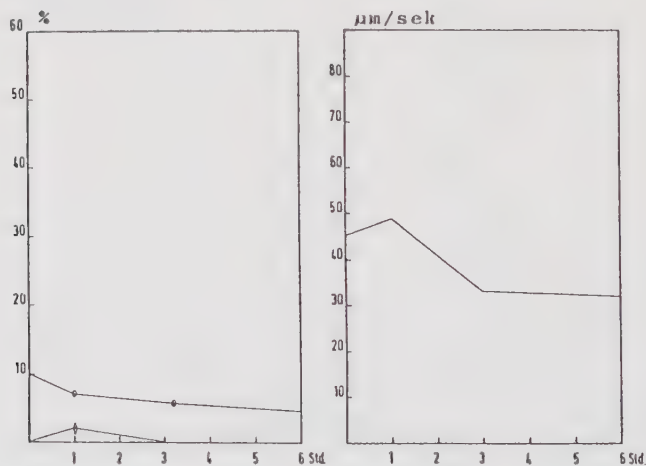


Abbildung 32: Patient 2061/83 (Asthenozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

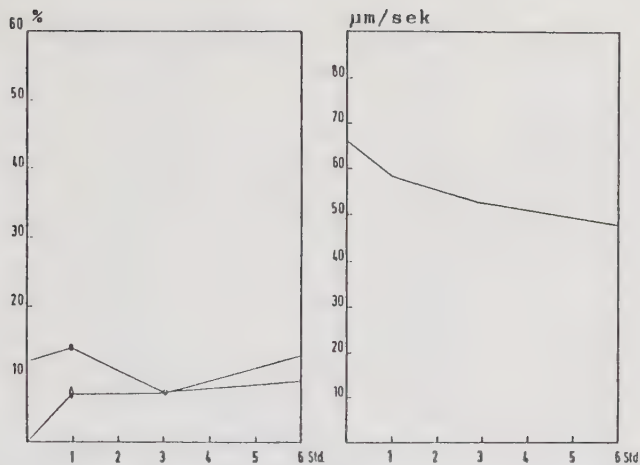


Abbildung 33: Patient 2084/83 (Asthenozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

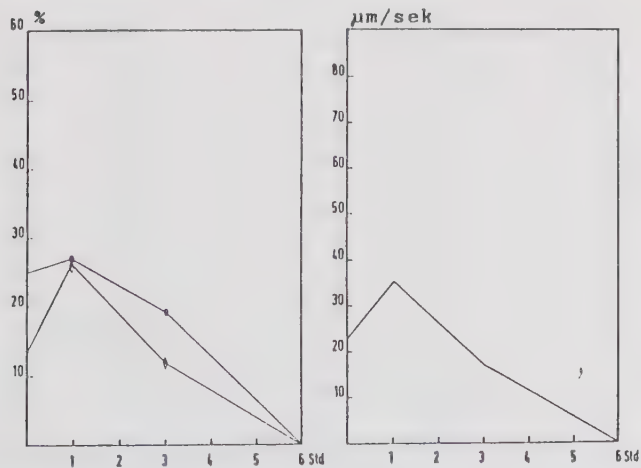


Abbildung 34: Patient 2426/83 (Asthenozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

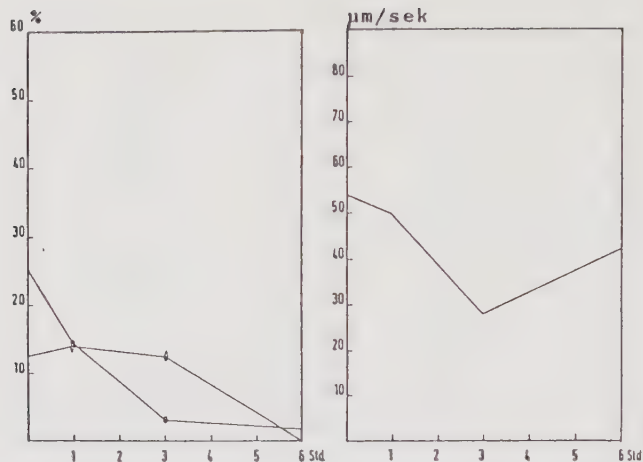


Abbildung 35: Patient p773/83 (Oligozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

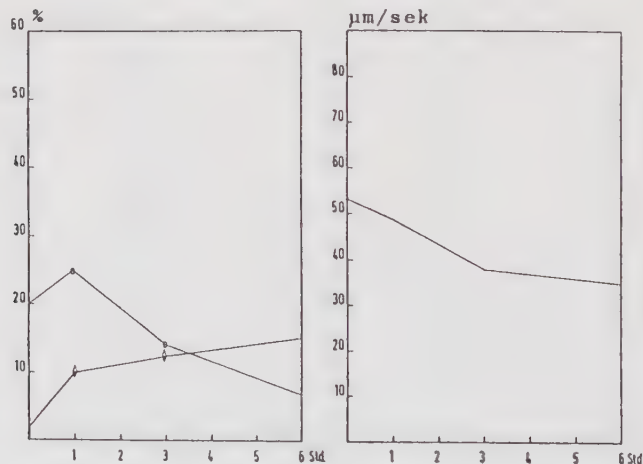


Abbildung 36: Patient 1938/83 (Oligozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

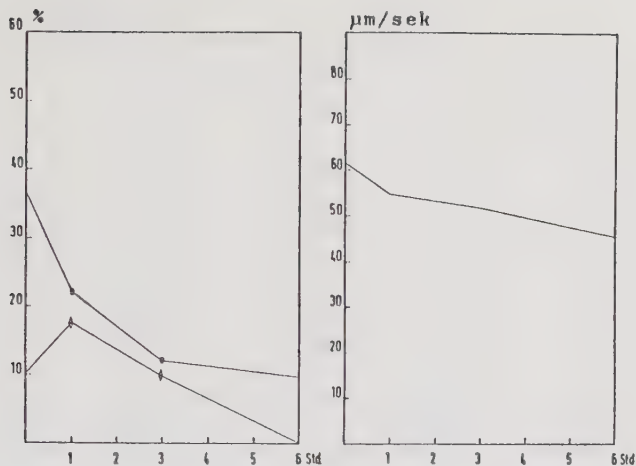


Abbildung 37: Patient 2020/83 (Oligozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

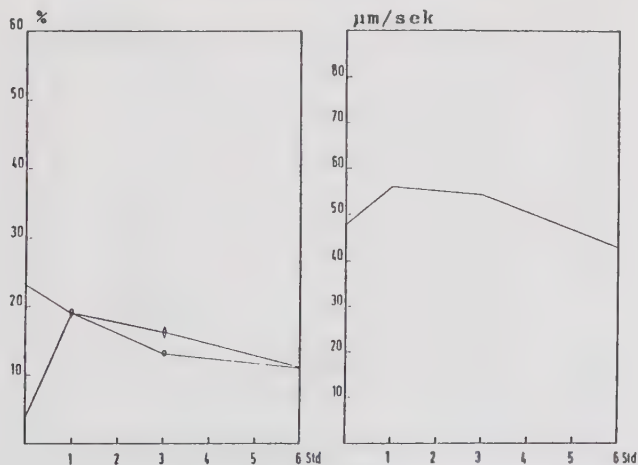


Abbildung 38: 2031/83 (Oligozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

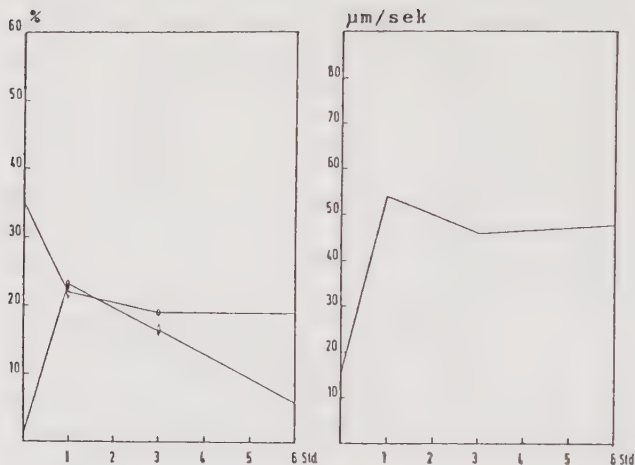


Abbildung 39: Patient 2062/83 (Oligozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

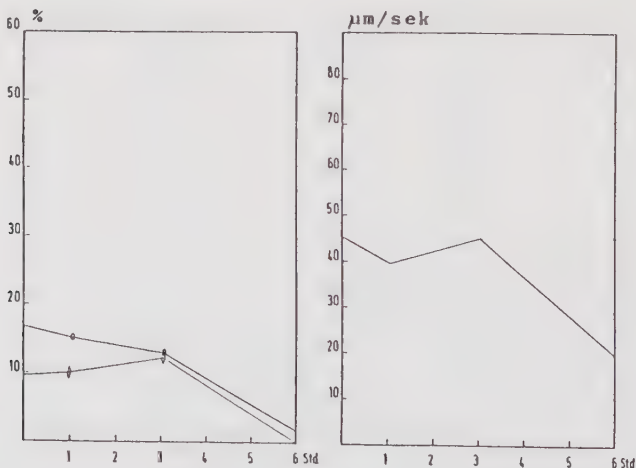


Abbildung 40: Patient 2081/83 (Oligozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

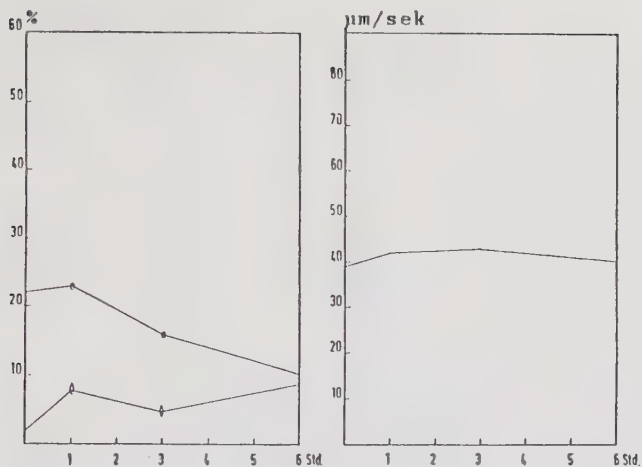


Abbildung 41: Patient 1936/83 (Teratozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

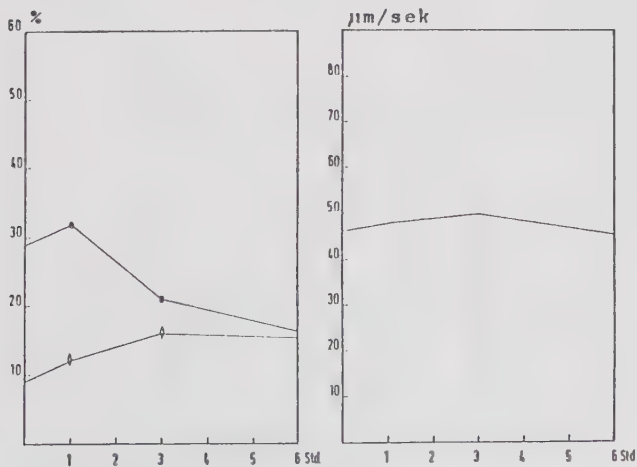


Abbildung 42: Patient 1991/83 (Teratozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

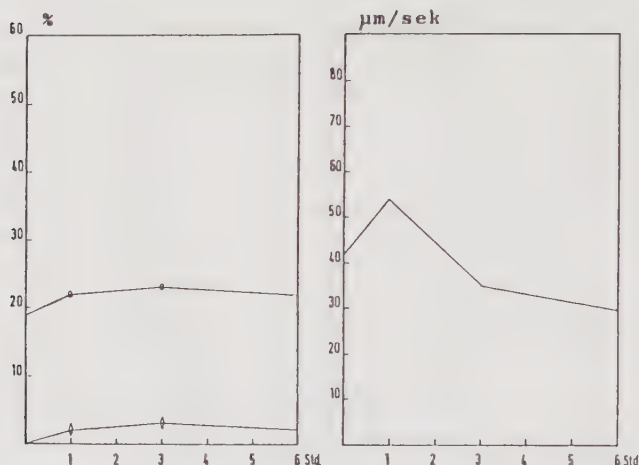


Abbildung 43: Patient 2016/83 (Teratozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

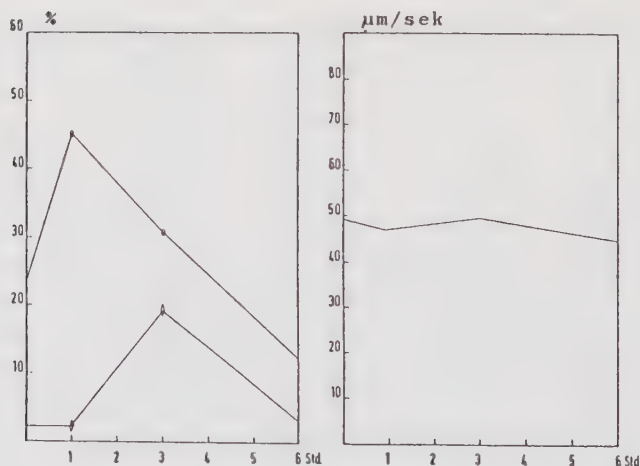


Abbildung 44: Patient 2428/83 (Teratozoospermie). Siehe auch Legende Seite 65.

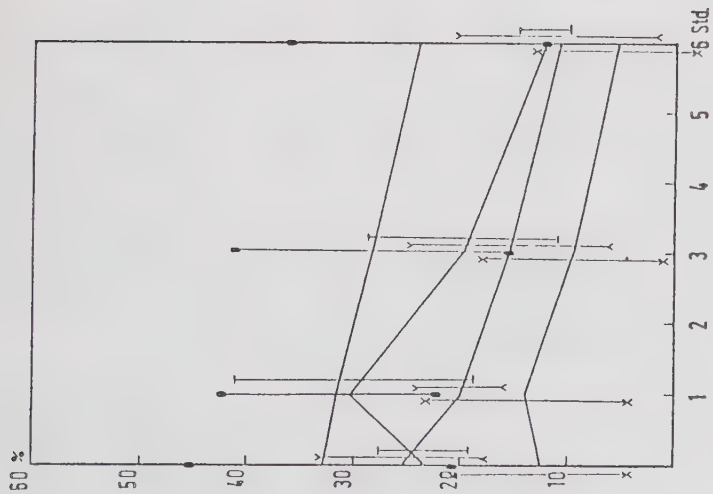
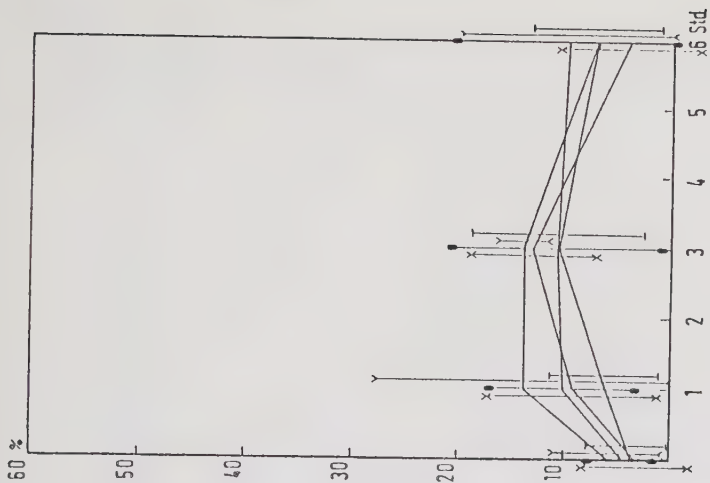
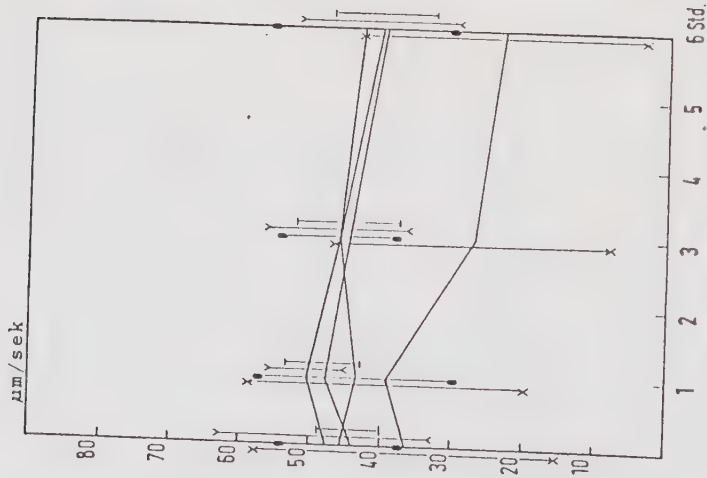


Abbildung 45 (links) und 46 (rechts):

Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen der % motilen von allen Spermatozoen (Abb. 45) und der hyperaktivierten Spermatozoen von den motilen (Abb. 46). Reihenfolge der Kurven von oben nach unten zur Zeit  $t = 6h$ . Abb. 45: Normo-, Terato-, Oligo- und Asthenozoospermien. Abb. 46: Normo-, Oligo-, Terato- und Asthenozoospermien. Siehe auch Legende Seite 86.





Legende für die Markierungen  
der Standardabweichungen  
in Abbildung 45 bis 47

- Normozoospermie (n=7)
- X Asthenozoospermie (n=7)
- v Oligozoospermie (n=6)
- Teratozoospermie (n=4)

Abbildung 47: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Spermatozoengeschwindigkeiten. Reihenfolge der Kurven von oben nach unten zur Zeit  $t = 6h$ . Normo-, Oligo-, Terato- und Asthenozoospermien.

p-Werte für den Anstieg der whiplash-Bewegung zwischen 0h und 3h (Abb. 46):

Normozoospermie  $p < 0.05$

Oligozoospermie  $p < 0.10$

Teratozoospermie  $p < 0.20$

Asthenozoospermie  $p < 0.05$

Tabelle 3:

| Patient<br>Nr.: | vitale<br>intaktes<br>Akrosom | Spermatozoen<br>reagiertes<br>Akrosom<br>(in %) | tote<br>Spermato-<br>zoen<br>(in %) | motile<br>Spermato-<br>zoen<br>(in %) | hyperakt.<br>Spermato-<br>zoen<br>(in %) | Spermato-<br>zoen<br>Geschwindig-<br>keit ( $\mu\text{m}/\text{sek}$ ) |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 1940/83         |                               |                                                 |                                     |                                       |                                          |                                                                        |
| t = 0h          | 39                            | 22                                              | 39                                  | 45                                    | 5                                        | 54                                                                     |
| t = 1h          | 39                            | 21                                              | 40                                  | 44                                    | 4                                        | 53                                                                     |
| t = 3h          | 33                            | 23                                              | 44                                  | 35                                    | 6                                        | 51                                                                     |
| t = 6h          | 16                            | 28                                              | 56                                  | 22                                    | 8                                        | 49                                                                     |
| 2001/83         |                               |                                                 |                                     |                                       |                                          |                                                                        |
| t = 0h          | 40                            | 31                                              | 29                                  | 39                                    | 2                                        | 42                                                                     |
| t = 1h          | 34                            | 32                                              | 34                                  | 42                                    | 5                                        | 49                                                                     |
| t = 3h          | 27                            | 37                                              | 36                                  | 45                                    | 4                                        | 49                                                                     |
| t = 6h          | 23                            | 39                                              | 38                                  | 38                                    | 8                                        | 47                                                                     |
| 2018/83         |                               |                                                 |                                     |                                       |                                          |                                                                        |
| t = 0h          | 49                            | 25                                              | 26                                  | 25                                    | 3                                        | 54                                                                     |
| t = 1h          | 43                            | 30                                              | 27                                  | 27                                    | 11                                       | 42                                                                     |
| t = 3h          | 31                            | 34                                              | 35                                  | 16                                    | 16                                       | 35                                                                     |
| t = 6h          | 26                            | 31                                              | 43                                  | 12                                    | 1                                        | 24                                                                     |
| 2060/83         |                               |                                                 |                                     |                                       |                                          |                                                                        |
| t = 0h          | 36                            | 28                                              | 36                                  | 14                                    | 0                                        | 35                                                                     |
| t = 1h          | 27                            | 27                                              | 46                                  | 17                                    | 6                                        | 19                                                                     |
| t = 3h          | 20                            | 34                                              | 46                                  | 13                                    | 8                                        | 49                                                                     |
| t = 6h          | 10                            | 39                                              | 51                                  | 11                                    | 7                                        | 44                                                                     |

2080/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 39 | 21 | 40 | 22 | 0  | 55 |
| t = 1h | 34 | 23 | 43 | 23 | 2  | 51 |
| t = 3h | 25 | 32 | 43 | 34 | 15 | 58 |
| t = 6h | 8  | 46 | 46 | 28 | 17 | 56 |

2400/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 50 | 26 | 24 | 32 | 4  | 41 |
| t = 1h | 39 | 34 | 27 | 32 | 21 | 55 |
| t = 3h | 22 | 50 | 28 | 40 | 25 | 53 |
| t = 6h | 12 | 56 | 32 | 36 | 27 | 58 |

2401/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 49 | 35 | 16 | 42 | 9  | 48 |
| t = 1h | 33 | 51 | 16 | 27 | 10 | 45 |
| t = 3h | 28 | 54 | 18 | 22 | 3  | 39 |
| t = 6h | 23 | 59 | 18 | 23 | 5  | 36 |

p773/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 39 | 31 | 30 | 25 | 13 | 54 |
| t = 1h | 26 | 33 | 41 | 15 | 14 | 50 |
| t = 3h | 20 | 37 | 43 | 3  | 13 | 28 |
| t = 6h | 14 | 39 | 47 | 2  | 0  | 42 |

1938/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 35 | 19 | 46 | 20 | 2  | 52 |
| t = 1h | 26 | 20 | 54 | 25 | 10 | 49 |
| t = 3h | 12 | 22 | 66 | 14 | 12 | 38 |
| t = 6h | 5  | 22 | 73 | 7  | 15 | 35 |

2031/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 48 | 19 | 33 | 23 | 4  | 48 |
| t = 1h | 38 | 26 | 36 | 19 | 19 | 56 |
| t = 3h | 18 | 42 | 40 | 13 | 17 | 55 |
| t = 6h | 13 | 30 | 57 | 11 | 11 | 5  |

2062/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 50 | 28 | 22 | 35 | 2  | 16 |
| t = 1h | 38 | 34 | 28 | 22 | 23 | 54 |
| t = 3h | 27 | 39 | 34 | 19 | 16 | 46 |
| t = 6h | 23 | 41 | 36 | 19 | 6  | 48 |

2080/83

| t = 0h | 39 | 21 | 40 | 22 | 0  | 55 |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 1h | 34 | 23 | 43 | 23 | 2  | 51 |
| t = 3h | 25 | 32 | 43 | 34 | 15 | 58 |
| t = 6h | 8  | 46 | 46 | 28 | 17 | 56 |

2081/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 40 | 22 | 38 | 16 | 10 | 45 |
| t = 1h | 35 | 26 | 39 | 15 | 10 | 40 |
| t = 3h | 17 | 34 | 49 | 14 | 13 | 45 |
| t = 6h | 9  | 38 | 53 | 2  | 0  | 20 |

1996/83

|        |    |    |    |   |   |   |
|--------|----|----|----|---|---|---|
| t = 0h | 42 | 20 | 38 | 0 | 0 | 0 |
| t = 1h | 40 | 19 | 41 | 3 | 0 | 0 |
| t = 3h | 25 | 27 | 48 | 0 | 0 | 0 |
| t = 6h | 17 | 27 | 56 | 0 | 0 | 0 |

1997/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 31 | 17 | 52 | 14 | 5  | 40 |
| t = 1h | 27 | 23 | 50 | 14 | 12 | 34 |
| t = 3h | 24 | 25 | 51 | 11 | 27 | 23 |
| t = 6h | 19 | 26 | 55 | 3  | 0  | 29 |

1998/83

|        |    |    |    |   |   |    |
|--------|----|----|----|---|---|----|
| t = 0h | 53 | 27 | 20 | 7 | 0 | 32 |
| t = 1h | 48 | 29 | 23 | 8 | 0 | 52 |
| t = 3h | 36 | 33 | 31 | 1 | 0 | 14 |
| t = 6h | 24 | 41 | 35 | 1 | 0 | 9  |

2017/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 46 | 31 | 23 | 20 | 2  | 51 |
| t = 1h | 25 | 45 | 30 | 26 | 8  | 47 |
| t = 3h | 11 | 60 | 29 | 23 | 11 | 49 |
| t = 6h | 9  | 62 | 28 | 21 | 15 | 45 |

2061/83

|        |    |    |    |    |   |    |
|--------|----|----|----|----|---|----|
| t = 0h | 49 | 26 | 25 | 10 | 0 | 45 |
| t = 1h | 39 | 31 | 30 | 7  | 2 | 49 |
| t = 3h | 22 | 35 | 43 | 6  | 0 | 33 |
| t = 6h | 18 | 33 | 49 | 5  | 0 | 32 |

2084/83

|        |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|
| t = 0h | 42 | 19 | 39 | 12 | 0  | 66 |
| t = 1h | 38 | 22 | 40 | 14 | 7  | 59 |
| t = 3h | 28 | 27 | 45 | 8  | 8  | 53 |
| t = 6h | 10 | 37 | 53 | 9  | 13 | 48 |

|         |    |    |    |    |    |    |
|---------|----|----|----|----|----|----|
| 2426/83 |    |    |    |    |    |    |
| t = 0h  | 38 | 35 | 27 | 25 | 14 | 23 |
| t = 1h  | 29 | 42 | 29 | 27 | 26 | 35 |
| t = 3h  | 13 | 51 | 36 | 19 | 12 | 17 |
| t = 6h  | 9  | 39 | 52 | 0  | 0  | 0  |
| 1991/83 |    |    |    |    |    |    |
| t = 0h  | 47 | 15 | 37 | 29 | 9  | 46 |
| t = 1h  | 42 | 20 | 38 | 32 | 12 | 48 |
| t = 3h  | 31 | 23 | 47 | 21 | 16 | 50 |
| t = 6h  | 14 | 34 | 52 | 16 | 15 | 45 |
| 1936/83 |    |    |    |    |    |    |
| t = 0h  | 42 | 22 | 36 | 22 | 2  | 39 |
| t = 1h  | 35 | 25 | 40 | 23 | 8  | 42 |
| t = 3h  | 15 | 27 | 58 | 16 | 5  | 43 |
| t = 6h  | 13 | 24 | 63 | 10 | 9  | 40 |
| 2016/83 |    |    |    |    |    |    |
| t = 0h  | 52 | 20 | 28 | 19 | 0  | 42 |
| t = 1h  | 37 | 25 | 38 | 22 | 2  | 54 |
| t = 3h  | 26 | 31 | 43 | 11 | 3  | 35 |
| t = 6h  | 19 | 38 | 43 | 11 | 2  | 30 |
| 2428/83 |    |    |    |    |    |    |
| t = 0h  | 61 | 16 | 23 | 24 | 2  | 49 |
| t = 1h  | 56 | 20 | 24 | 45 | 2  | 47 |
| t = 3h  | 52 | 22 | 26 | 31 | 19 | 50 |
| t = 6h  | 49 | 20 | 31 | 13 | 3  | 45 |

114/84

|        |    |   |    |
|--------|----|---|----|
| t = 0h | 32 | 3 | 65 |
| t = 1h | 27 | 4 | 69 |
| t = 3h | 24 | 3 | 73 |
| t = 6h | 20 | 3 | 77 |

123/84

|        |    |   |    |
|--------|----|---|----|
| t = 0h | 37 | 4 | 59 |
| t = 1h | 32 | 3 | 65 |
| t = 3h | 15 | 2 | 83 |
| t = 6h | 14 | 2 | 84 |

164/84

|        |    |   |    |
|--------|----|---|----|
| t = 0h | 27 | 6 | 67 |
| t = 1h | 29 | 5 | 66 |
| t = 3h | 21 | 4 | 75 |
| t = 6h | 16 | 2 | 82 |

165/84

|        |    |   |    |
|--------|----|---|----|
| t = 0h | 21 | 4 | 75 |
| t = 1h | 15 | 4 | 81 |
| t = 3h | 9  | 2 | 89 |
| t = 6h | 7  | 1 | 92 |

208/84

|        |    |   |    |
|--------|----|---|----|
| t = 0h | 49 | 5 | 46 |
| t = 1h | 39 | 5 | 56 |
| t = 3h | 36 | 4 | 60 |
| t = 6h | 31 | 3 | 65 |

209/84

t = 0h

38

9

53

t = 1h

37

10

53

t = 3h

30

9

61

t = 6h

16

3

81

267/84

t = 0h

59

9

32

t = 1h

48

12

40

t = 3h

36

13

52

t = 6h

36

11

53

## 5.1. Allgemeines

Das Spermatozoon ist eine außerordentlich spezialisierte Zelle, die eine Vielzahl von Eigenschaften und Fähigkeiten besitzt, welche letztlich alle Voraussetzung für eine Funktion sind, nämlich die weibliche Eizelle zu befruchten. So vielfältig wie die Funktionen des Spermatozoons sind, so vielfältig sind aber auch seine möglichen Fehlerquellen.

Die Fortpflanzung ist für die Erhaltung und das Überleben einer Art von entscheidender Bedeutung. Das mag der Grund dafür sein, daß die Natur in diesem Bereich so verschwenderisch mit ihren Ressourcen umgeht. Für die Befruchtung einer Eizelle werden hunderte von Millionen von Spermatozoen eingesetzt, wovon letztlich nur ein einziges benötigt wird.

In dieser Arbeit wird die Aufmerksamkeit speziell auf die Akrosomreaktion, aber auch auf die Spermatozoenmotilität gerichtet. Beides sind Fähigkeiten, die das Spermatozoon unbedingt benötigt, wenn es eine Eizelle befruchten soll. Es ist daher denkbar, daß eine pathologische Akrosomreaktion die Fertilität einschränkt. Tatsächlich scheint das der Fall zu sein bei Polyzoospermiepatienten, die neben dem Defekt der Akrosomreaktion auch andere akrosomale Veränderungen aufweisen (siehe 5.4.2.).

Bei den übrigen andrologischen Diagnosegruppen (Normo-, Oligo-Astheno-, und Teratozoospermie) konnte nicht nachgewiesen werden, daß eine derartige Fehlfunktion für eine ganze Gruppe besteht, was aber nicht ausschließt, daß bei einzelnen Patienten aus den genannten Diagnosegruppen nicht dennoch auch ein akrosomaler Defekt eine Rolle für die Infertilität spielt.

Bei den hier dargestellten Untersuchungen wurde die von Talbot und Chancon (1981) angegebene "triple-stain"-Technik angewendet (siehe 3.5.).

Dabei wurden im ersten Teil der Untersuchung die Ejakulate im nativen, nicht gewaschenen Zustand untersucht; im zweiten Teil der Untersuchung wurden von den Ejakulaten Verläufe der Akrosomreaktion über 6 Stunden erstellt. Die Auswertung erfolgte im wesentlichen wie von Talbot und Chancon angegeben, Einzelheiten dazu sind unter 3.6. besprochen.

Die relativ große Zahl pathologischer Formen im menschlichen Ejakulat wurde, weil diese Spermatozoen unter den selektiven Bedingungen des weiblichen Genitaltraktes wohl kaum eine Chance haben, die Ampulle des Eileiters zu erreichen, von vorneherein bei der Auszählung der Präparate gar nicht berücksichtigt. Hinzu kommt, daß es auswertungstechnisch recht problematisch sein kann Spermatozoen zu beurteilen, die unter anderem auch am Akrosom Defekte aufweisen. Die angegebenen Werte gelten daher für morphologisch intakte Spermatozoen.

Als akrosomenreagiert wurden auch Spermatozoen gezählt, die im Bereich des Akrosoms eine deutliche Vesikulierung aufwiesen.

Diese Modifizierung der Auswertungskriterien mag eine Ursache dafür sein, daß im Vergleich zu anderen Gruppen (Reyes et. al., 1984; Plachot et. al., 1984) unsere Ergebnisse (Schill et. al., 1984, 1985; Töpfer-Petersen et. al., 1985; Töpfer-Petersen et. al., 1986) höhere Werte für die Akrosomreaktion ergeben. Hinzu kommt, daß von den anderen Untersuchern auch andere Inkubationsmedien verwendet wurden als bei unseren Versuchen. Plachot et.al. führten die Untersuchungen ausschließlich an motilen Spermatozoen durch und untersuchten nur ein Präparat nach einer 17 stündigen Inkubationszeit. Der Versuchsaufbau, der der Arbeit von Plachot zu Grunde liegt, unterscheidet sich damit derart erheblich von

dem dieser Arbeit, so daß die Ergebnisse nur schwer vergleichbar sind.

Eine weitere Untersuchung zur Akrosomreaktion von Malett et. al. (1985) ist leider auch ganz anders angelegt, da es sich um eine elektronenoptische Studie ausschließlich an motilen Spermatozoen handelt, welche zudem noch in anderen Medien inkubiert wurden.

Die technischen Vorteile des "triple-stainings" wurden schon weiter oben erwähnt (3.7.). Hier soll ein möglicher Nachteil des Verfahrens erwähnt werden, der sich auf die Untersuchung zur Kinetik der Akrosomreaktion auswirkt. Hierbei wurden die Ejakulate zunächst zweimal mit TMPA-BSA gewaschen und dann 15 Minuten in Trypanblau inkubiert, das in TMPA-HSA gelöst ist, um danach noch zweimal mit TMPA-BSA gewaschen zu werden. Das führt dazu, daß die Spermatozoen bevor sie fixiert werden zirka 45 Minuten in kapazitierenden Medien inkubiert sind. Somit entspricht der 0 Stundenwert eher einem 45 Minutenwert, entsprechend verschieben sich auch die Werte zu den anderen Zeitpunkten. Dieser Tatsache kommt deshalb besonders Bedeutung zu, weil die Akrosomreaktion zu Beginn der Inkubationszeit besonders dynamisch abläuft.

Dieses Problem lässt sich jedoch umgehen, indem mit zwei Puffersystemen gearbeitet wird, wovon nur eines kapazitierende Eigenschaften hat. Werden diese beiden Puffersysteme sinnvoll eingesetzt, dann lässt sich der störende Einfluß der Vorinkubation vermeiden.

### 5.3. Diskussion der Ergebnisse der Versuche in nicht kapazitierenden Medien

Wie die graphische Darstellung der Ergebnisse (Abbildung 9 bis 12) zeigt, ist die Zahl der akrosomreagierten Spermatozoen ein asymmetrisch verteiltes Merkmal. Das unterscheidet die Akrosomreaktion von den Parametern des üblichen Spermio-

gramms, die einer symmetrischen Normalverteilung unterliegen (Osser et al., 1983). Daher wurde die zentrale Tendenz für die Akrosomenreaktion auch als Medianwert angegeben und nicht wie für die anderen Parameter üblich als arithmetischer Mittelwert. Entsprechend wurden auch statt der Standardabweichungen die Interquartilbereiche angegeben.

Wie die Abbildung (13) zeigt überlappen die Interquartilbereiche der verschiedenen Diagnosegruppen sehr weit, d.h. mit anderen Worten, daß sich diese Diagnosegruppen in diesem Merkmal nicht unterscheiden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die Prozentzahl der akrosomreagierten Spermatozoen nach der Ejakulation für die Medianwerte zwischen 14% und 17% liegt (siehe auch 4.1.2.). Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Ergebnissen von Byrd und Wolf (1986) überein, die mit einem fluoreszenzmikroskopischen Verfahren zu dem Ergebnis kommen, daß 88%  $\pm$  6.1% der frisch ejakulierten Spermatozoen akrosomenintakt sind.

Festzuhalten ist auch, daß die Akrosomreaktion ein asymmetrisch verteiltes Merkmal ist.

Diese Betrachtungsweise ist wie auch die anderen klassischen Spermiogrammbefunde statisch und wird daher dem Vorgang der Akrosomreaktion, welche doch ein dynamisches sich über Stunden erstreckendes Ereignis ist, nicht in der Weise gerecht wie eine kinetische Untersuchung, die ebenfalls durchgeführt wurde und deren Ergebnisse in den folgenden Abschnitten dargestellt wird.

#### 5.4. Diskussion der Ergebnisse von Untersuchungen zur Kinetik der Akrosomreaktion (in kapazitierenden Medien)

Die kinetischen Untersuchungen zur Akrosomreaktion wurden in einem kapazitierenden Medium (TMPA siehe 3.4.2.) durchge-

führt, das mit Albumin und Kalzium-Ionen für die Kapazitation und Akrosomreaktion wesentliche Faktoren enthält (siehe dazu die theoretischen Vorbemerkungen unter 2.). Als Substrate des Energiestoffwechsels sind Pyruvat und Glukose im Medium vorhanden.

Der Zeitraum, innerhalb dessen der Verlauf der Akrosomreaktion beobachtet wurde, betrug 6 Stunden. Das ist der Zeitraum, den humane Spermatozoen zur Kapazitation benötigen 67,925-927

(Austin, 1974).

Weitere Erläuterungen zur Methode wurden bereits unter 5.2. gegeben.

Die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgte sowohl geordnet nach Diagnosegruppen (Abbildung 14 bis 19) als auch für alle Werte in einer Graphik (Abbildung 20), um einen Vergleich jenseits der üblichen Diagnosegruppen zu ermöglichen. Die offenbar pathologischen Werte der Polyzospermiegruppe wurden in den gemeinsamen Abbildungen nicht dargestellt aus Gründen der Übersichtlichkeit.

Aus diesen Abbildungen ist zu erkennen, daß es doch erhebliche Schwankungen zwischen den einzelnen Befunden gibt (einzelne Kurven werden unter 5.4.5. diskutiert).

Welche Befunde pathologisch sind läßt sich gegenwärtig nicht sagen, da Grenzwerte bisher noch nicht definiert sind (siehe auch 5.4.4.)

Zu der Entscheidung, die Einzelwerte darzustellen und zu diskutieren, soll noch angefügt werden, daß Singer et.al. (1985) in einer Arbeit, die sich mit den Oberflächeneigenschaften der Spermatozoenmembran beschäftigt, die Meinung vertreten, daß durch die Verwendung zusammenfassender Statistiken wichtige Unterschiede verborgen werden können, solange die Ursachen der erheblichen Variabilität nicht bekannt sind.

#### 5.4.1. Diskussion der Ergebnisse der Polyzoospermiegruppe

Wie Abbildung (19) deutlich zeigt, ist die Akrosomreaktion bei Patienten mit Polyzoospermie verglichen mit allen anderen Diagnosegruppen deutlich verringert. Die in den Abbildungen angegebenen Interquartilbereiche überlappen nicht. Der Anstieg der Kurve wie ihn die anderen Diagnosegruppen zeigen bleibt aus. Vielmehr fällt die Kurve nach einer Stunde bereits wieder leicht ab. Die Zahl der akrosomal reagierten Spermatozoen ist gering. 90% bis 95% der Spermatozoen bleiben akrosomintakt. Dabei muß allerdings bedacht werden, daß sich die Verhältnisse in absoluten Zahlen ganz anders darstellen. Dazu ein kleines Beispiel:

Ein hypothetischer Patient A ist normozoosperm. In seinem Ejakulat werden 50 Mio. Spermatozoen/ml gefunden, davon seien 50% akrosomenreagiert, d.h. in diesem Ejakulat findet man 25 Mio. akrosomenreagierte Spermatozoen/ml.

Der hypothetische Patient B dagegen ist polyzoosperm mit einer Spermatozoenkonzentration von 300 Mio./ml, davon sind nur 10% akrosomenreagiert oder mit anderen Worten 30 Mio./ml. Damit hat der polyzoosperme Patient, wenn man gleiche Ejakulatvolumina unterstellt sogar mehr akrosomenreagierte Spermatozoen im Ejakulat als der Patient mit Normalbefund. Dieses Beispiel soll verdeutlichen, daß es nicht so sehr auf den statischen Befund zu einer bestimmten Zeit ankommt, sondern auf den Anstieg der Akrosomreaktion. Die Ursache dafür dürfte darin zu suchen sein, daß es in vivo nicht gleichgültig ist, wo die Akrosomreaktion stattfindet. Das wiederum hängt damit zusammen, daß bei der Akrosomreaktion Enzyme freigesetzt werden, die zur Durchdringung der Eihüllen benötigt werden. Findet die Akrosomreaktion nicht in unmittelbarer Nähe der Eihüllen statt, gehen die Penetrationsenzyme ungenutzt verloren. Funktionell wichtig sind daher nicht so sehr die akrosomenreagierten Spermatozoen, sondern die, die sich im Vorgang der Akrosomreaktion befinden. Diese Überlegungen werden durch die Untersuchungen von

Yanagimachi und Phillips (1984) unterstützt, die bei Hamster-spermatozoen zeigten, daß die Akrosomreaktion während der Penetration durch den Cumulus stattfindet. Reste des Akrosoms sind noch vorhanden, wenn das Spermatozoon die Zona pellucida erreicht. Dieser Rest wird dann an der Zona abgestreift. Die Ursache der Subfertilität bzw. der Infertilität der Patienten mit Polyzoospermie ist also in einem akrosomalen Defekt zu suchen. Es ist jedoch nicht nur die Akrosomreaktion defekt, sondern auch intraakrosomale Faktoren tragen zu dieser Funktionsstörung bei. So gelang es schon 1974 nachzuweisen, daß das trypsinähnliche Penetrationsenzym Akrosin bei Patienten mit Polyzoospermie vermindert ist (Schill, 1974). In breiter angelegten Studien wurden in der Folge Untersuchungen zur Akrosomreaktion, Akrosinaktivität und zum Nachweis eines Akrosininhibitors durchgeführt. Es konnte mit Hilfe eines monospezifischen, mit humanem Akrosin kreuzreagierenden Antikörpers gegen Eberakrosin gezeigt werden, daß der Anteil der akrosinnegativen Spermatozoen bei Polyzoospermie nicht höher ist als bei Normozoospermien. Da aber die Akrosinaktivität insgesamt deutlich niedriger als bei Normozoospermien ist, folgt daraus, daß die Akrosinkonzentration pro Spermatozoon erniedrigt sein muß (Schill u. Feifel, 1984; Schill et.al., 1984; Schill et.al., 1985). Weiter ergab sich, daß ein Akrosininhibitor, der normalerweise im Akrosom gefunden wird, ebenfalls deutlich erniedrigt ist (Tschesche et.al., 1982). Daher mag es sein, daß das aggressive Akrosin auf Grund des Mangels an Inhibitor frühzeitig das Akrosom schädigt und dadurch eine normale Akrosomreaktion verhindert. Bisher sind also im wesentlichen drei akrosomale Faktoren bekannt, welche die Funktionseinschränkung der Samenzellen bei Patienten mit Polyzoospermie begründen:

1. Die Akrosinaktivität ist vermindert.
2. Es liegt ein Mangel an Akrosininhibitor vor.

### 3. Der Ablauf der Akrosomreaktion ist gestört.

Ein interessanter Gegenstand zukünftiger Untersuchungen wird es sein herauszufinden, ob und wie diese drei genannten Punkte und die Tatsache, daß im Verlauf der Spermiogenese eine außerordentlich große Zahl von Spermatozoen gebildet wird, zusammenhängen und ob es eventuell eine gemeinsame Ursache dieser Phänomene gibt.

Bisher werden in diesem Zusammenhang genetische Defekte der Spermatozoen diskutiert, da einerseits zytophotometrische Messungen nach Feulgenfärbung erniedrigte DNA-Werte ergaben (Meyhöfer, 1963) und andererseits impulszytophotometrische Messungen der DNA eine erhöhte Rate defekter Spermatozoen ergaben (Vogt, et.al., 1984). Diese DNA-Veränderungen sind auch deshalb interessant, weil die spontane Abortrate bei Paaren mit Polyzoospermie, sehr hoch ist. Barnea et. al. (1980) geben für Paare, bei denen der Vater eine Polyzoospermie aufweist, eine Spontanabortrate von 25.8% an. Diese Tatsache wurde durch die Untersuchungen von Glezerman et. al. (1982) bestätigt, die eine Spontanabortrate von 25% feststellten.

#### 5.4.2. Diskussion der Ergebnisse der Normo-, Oligo-, Astheno- und Teratozoospermien

Wie die Abbildung (19 A) und (B) zeigen, gilt auch in diesen Patientengruppen für die Kinetik der Akrosomreaktion das, was sich bei den Versuchen im ersten Teil dieser Arbeit abzeichnete. Die Werte für die einzelnen andrologischen Diagnosegruppen unterscheiden sich im "triple-staining" nicht wesentlich von einander. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Plachot et. al. (1984), die berichten, daß Patienten mit Oligozoospermie und Asthenozoospermie dieselbe Rate reagierter lebendiger oder toter

Spermatozoen hatten wie Patienten mit normalen Spermiogrammbefunden. Allerdings liegt die Zahl der akrosomenreagierten Spermatozoen in dieser Studie insgesamt unter den hier gefundenen Werten (siehe auch 5.2.).

Bei allen hier zu diskutierenden Gruppen kommt es zur Akrosomreaktion, also zur Zunahme akrosomenreagierter Spermatozoen über den Zeitraum von 6 Stunden. Die Dynamik der Akrosomreaktion schwächt sich dabei über den Untersuchungszeitraum ab. Der Unterschied zu den Befunden der Polyzospermiegruppe ist evident, da es dort nicht zum Anstieg der Akrosomreaktion kommt.

Ein wesentliches Problem dieser Betrachtungsweise, welche die Akrosomreaktion in Abhängigkeit üblicher andrologischer Befunde darstellt, ist es sicher, daß diese Spermiogrammbefunde häufig selbst keine sicheren Aussagen über die Fertilität eines Patienten zulassen. Aitken et.al. (1985) berichten in einer prospektiven Studie an Oligozoospermiepatienten, daß keiner der üblichen Spermparameter geeignet ist vorherzusagen, welcher Patient fertil ist. Immerhin kam es in dieser Studie bei 25,6% der Partnerinnen dieser Männer zu einer Schwangerschaft. Auch der zona-freie Hamstereitest (HOP-Test) (Yanagimachi et.al., 1976) erwies sich als ungeeignet, da Patienten, deren Spermatozoen im HOP-Test völlig versagten, fähig waren, Schwangerschaften auszulösen.

Andere Untersuchungen, die den weiblichen Fertilitätsfaktor mit berücksichtigten, kommen zu dem Ergebnis, daß sogar 50% der Patienten mit Oligozoospermie in der Lage sind, eine Schwangerschaft auszulösen (Smith et.al., 1977). Selbst bei Partnerinnen von Patienten mit Spermatozoenkonzentrationen von nur 2 Mio./ml wurden noch Schwangerschaften beobachtet (Barfield et.al., 1979).

Aus dem Gesagten soll klar werden, daß sich unter dem Befund der Oligozoospermie zwei sehr unterschiedliche Kollektive von Patienten befinden, nämlich Patienten, die fähig sind eine Schwangerschaft auszulösen und solche, bei denen das nicht der Fall ist. Daher muß es noch andere Faktoren neben dem Befund der Oligozoospermie geben, die über die Fertilität

entscheiden.

Was hier für die Oligozoospermie gesagt wurde, gilt sinngemäß auch für die anderen andrologischen Befunde. Auch hier treten Schwangerschaftsraten von mehr als 30% auf (Barfield et.al., 1979; Rodriguez-Rigau, 1981).

Mit Recht darf daher die Aussagekraft der andrologischen Einzelbefunde angezweifelt werden, wenn eine zuverlässige Prognose der Fertilität gewünscht wird. Bei der außerordentlichen Komplexität der Vorgänge, die notwendig sind, um die Eizelle zu befruchten, ist es nicht verwunderlich, daß eine Vielzahl möglicher Störfaktoren gleichzeitig in Frage kommen.

#### 5.4.3. Wo sind die Grenzen für den normalen Ablauf der Akrosomreaktion ?

Bisher sind für die Kinetik der Akrosomreaktion noch keine Normalwerte definiert. Die Grenzen zwischen pathologischem, die Fertilität einschränkendem Verlauf der Akrosomreaktion und dem Normalbefund müssen erst noch bestimmt werden. Wie andere andrologische Parameter beweisen, ist diese Grenzziehung meist sehr schwierig und kontrovers. So wurde beispielsweise der Grenzwert für die Oligozoospermie im Laufe der Jahre immer wieder nach unten korrigiert und liegt derzeit bei 20 Mill./ml.

Hier sollen hypothetisch die möglichen Grenzen nach oben und nach unten diskutiert werden:

1. Die Akrosomreaktion läuft nicht oder nur stark vermindert ab. Dies scheint der Fall zu sein bei den Polyzoospermiepatienten, die insgesamt über die gesamte Inkubationsdauer nur eine geringe Prozentzahl akrosomenreagerter Spermatozoen aufweisen. Daneben ist auch denkbar, daß es zu einer qualitativen Ver-

schlechterung kommt. Auch das scheint bei den Polyzospermien der Fall zu sein, da auch die Inhaltsstoffe des Akrosoms beeinträchtigt sind (siehe 5.4.1.).

2. Die Akrosomreaktion läuft zu schnell ab, damit kommt es letztlich zu einer Synchronisation der Akrosomreaktion. Das ist aus den folgenden Gründen ungünstig. Einmal besteht die Gefahr, daß die Akrosomreaktion schon auf dem Weg des Spermatozoons zur Ampulle eintritt, somit würde das Spermatozoon seine Penetrationsenzyme verlieren, bevor es auf den Cumulus trifft. Zum anderen ist die normale dyssynchrone Akrosomreaktion auch deshalb günstig, weil dann die zeitliche Toleranz zwischen Koitus und Eisprung größer sein kann (siehe auch 2.2.2.).

Um diese Hypothesen zu überprüfen, sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Das gilt besonders für die zweite Hypothese.

Generell ist zu bedenken, daß eine monokausale Betrachtungsweise vermutlich nur Extrembefunden gerecht wird. Bei einem Patient, der beispielsweise kein motiles oder kein vitales Spermatozoon im Ejakulat hat, ist auch mit keiner Fertilität zu rechnen. Solche Fälle sind jedoch selten. Meistens dürften der Sub- oder Infertilität aber mehrere Ursachen zu Grunde liegen.

Ein Beispiel soll hier die Problematik andrologischer Einzelbefunde verdeutlichen:

Patient A hat folgenden Spermiogrammbefund:

120 Mio.Spermatozoen/ml

60 % sind davon immotil

Alle anderen Parameter sind im Normbereich.

Diagnose: Asthenozoospermie

Patient B hat folgenden Spermiogrammbefund:

70 Mio.Spermatozoen/ml

60 % sind davon motil

Alle anderen Parameter wie Patient A

Diagnose: Normozoospermie

Obwohl Patient B weniger motile Spermatozoen im Ejakulat hat als Patient A, ist es dennoch ein Normbefund. Patient A dagegen wird als Asthenozoospermie bezeichnet, was zunächst nahelegt, daß das Ejakulat zu wenig motile Zellen enthält. Das trifft aber in Wirklichkeit nicht zu. Wesentlich komplexer, aber realistischer wäre es, auch die anderen Spermiogrammbefunde zu berücksichtigen und nicht wie in diesem Beispiel gleichzusetzen.

Will man also in Zukunft zu zuverlässigeren Fertilitätsprognosen kommen, dann wird es notwendig sein, die erhobenen Einzelbefunde in geeigneter Weise zu kombinieren, um damit der Polykausalität der Infertilität mehr gerecht zu werden.

Zuverlässige Prognosen sind besonders deshalb wünschenswert, weil dann infertilen Paaren früher geholfen werden kann und nicht mehr so sehr die Zeit, seit der der unerfüllte Kinderwunsch besteht, ein wichtiges Kriterium sein wird für die Entscheidung zu eingreifenderen medizinischen Maßnahmen.

Die Kinetik der Akrosomreaktion mag dann eine der Komponenten eines solchen kumulativen Fertilitätsquotienten sein.

Aitken et.al. (1985) konnte in einer prospektiven Studie bei Patienten mit Oligozoospermie mit 85.2 % Genauigkeit die Fertilität der Patienten vorhersagen, indem sieben Parameter kombiniert wurden. Die Einzelbefunde jedoch ließen keine Vorhersagen über die Fertilität zu. Das Ergebnis dieser Studie bestätigt also im Grunde das zuvor Gesagte.

#### 5.4.4. Diskussion einzelner Kurvenverläufe

Auf Grund der Tatsache, daß sich die Einzelbefunde der Patienten zum Teil sehr stark unterscheiden, sollen hier einige Befunde gesondert diskutiert werden.

Patient 2428/83: Die flache Kinetik dieses Patienten erinnert an den Kurvenverlauf bei den Polyzospermiepatienten.

Patienten 2426/83 und 2031/83: In der Darstellungsweise der Abbildung 20 A fällt die starke Abnahme des prozentualen Anteils der akrosomenreagierten Spermatozoen jenseits der 3. Stunde auf. Ganz anders stellt sich die Situation dar, wenn die Zahl der akrosomenreagierten Spermatozoen in Bezug auf die vitalen Zellen dargestellt werden, dann liegt der Anteil der akrosomenreagierten Spermatozoen relativ hoch (Abbildung 20 B). Die Ursache für den Abfall akrosomenreagierter Spermatozoen in Abbildung 20 A liegt also in der schlechten Vitalität des Ejakulates begründet. Ein Beispiel dafür wie sich unterschiedliche Spermatozoenparameter beeinflussen können.

Patienten 2080/83, 2084/83, 1991/83 und 1940/83: Während in der Regel die Dynamik der Akrosomreaktion nach 3 Stunden abnahm, steigerte sie sich hier nochmals. Werden zusammenfassende statistische Methoden verwendet, dann werden solche Besonderheiten niveliert und fallen nicht mehr auf. Zieht man das unter 5.4.4. Gesagte mit in Erwägung, dann mag das ein günstiger Befund sein, da die Akrosomreaktion erst dann richtig anläuft, wenn schon einige Zeit vergangen ist. Die Spermatozoen in vivo also wohl schon im Bereich der Ampulle wären.

Patienten 2017/83, 2400/83 und 2401/83: Bei diesen Patienten verlief die Akrosomreaktion besonders schnell und ausgeprägt. Werden die akrosomenreagierten Spermatozoen auf die vitalen Spermatozoen bezogen, dann zeigen noch weitere Ejakulate (z.B. 2017/83 und 2400/83) einen sehr steilen Verlauf der Akrosomreaktion. Hier ist es denkbar, daß sich die Spermatozoen, die zur Akrosomreaktion fähig sind, auch eine bessere Vitalität zeigen, so daß sie gewissermaßen selektiert werden. Ob diese ausgeprägte Dynamik insgesamt der Fertilität förderlich ist, oder unter dem Aspekt, der unter 5.4.4. Punkt 2. diskutiert wurde zu sehen ist muß derzeit offen bleiben.

Solange es noch nicht feststeht, in welchen Grenzen die Dynamik der Akrosomreaktion als normal betrachtet werden darf, ist die Bewertung der durch das "triple-staining" erhobenen Befunde nicht sicher möglich. Ein lohnenswerter Gegenstand zukünftiger Untersuchungen wird es daher sein, diese Grenzwerte zu definieren.

Bei anderen Parametern wie z.B. der Spermatozoenkonzentration, der Motilität und Morphologie stellte sich eine nicht unerhebliche Schwankung der Werte zwischen verschiedenen Ejakulaten desselben Patienten heraus (Katz et. al., 1981). Es ist denkbar, daß das auch für die Ergebnisse des "triple-staining" gilt. Dieser Frage sollten daher weitere Untersuchungen gelten.

## 5.5. Diskussion der Motilitätsparameter

Die Motilitätsparameter wurden mit Hilfe der unter 3.8. beschriebenen Dunkelfeldmethode erhoben. Die Ergebnisse der einzelnen Ejakulate sind in den Abbildungen (21) bis (44) dargestellt. Abbildung (45) bis (47) zeigen den Verlauf für die Mittelwerte der einzelnen Diagnosegruppen und die Standardabweichungen.

Besonders auffällig verhalten sich erwartungsgemäß die Patienten mit Asthenozoospermie. Bei dieser Patientengruppe ist die Motilität vielfach derart stark eingeschränkt, daß diese Tatsache alleine als Ursache der Infertilität in Frage kommen mag.

Einzelne Asthenozoospermiepatienten zeigen aber durchaus, daß es in dieser Gruppe Patienten gibt, bei denen die wenigen motilen Spermatozoen eine gute Progressivmotilität zeigen (2017/83, 2061/83, 2084/83). Entsprechendes gilt für die Fähigkeit zur hyperaktivierten Bewegung, so zeigen die Patienten 1997/83, 2017/83, 2084/83 und 2426/83 eine ausgeprägte Hyperaktivierung. Absolut ist die Zahl hyperaktivierter Spermatozoen jedoch gering, da die Zahl motiler Zellen insgesamt gering ist.

Die übrigen Diagnosegruppen unterscheiden sich in Bezug auf die Durchschnittswerte der % motilen Spermatozoen insofern, als daß die Werte der Normozoospermien stets über denen der anderen Diagnosegruppen liegen. Das gilt jedoch nicht für den Anteil der Spermatozoen, die "whiplash" Bewegungen zeigen und ebenfalls nicht für die Durchschnittsgeschwindigkeiten. Die Schwankungsbreite der Werte ist groß, was sich in den Standardabweichungen niederschlägt.

Bei einigen Patienten mit Oligozoospermie (p773/83, 2020/83, 2081/83), die im Routinelabor bezüglich der Motilität keinen pathologischen Befund haben, scheint dennoch die Motilität beeinträchtigt zu sein. Das schlägt sich in einem steilen Abfall der Ausgangswerte über die Inkubationszeit nieder. Einzelne Patienten mit Normozoospermie (1940/83, 2018/83) und

ein Patient aus der Gruppe der Teratozoospermien (2428/83) verhalten sich ähnlich.

Wie schon unter 5.4. diskutiert, zeigt sich hier wieder, daß die Fertilität das Produkt vieler Faktoren ist, Infertilität andererseits nur in einigen Fällen durch einen Parameter erklärt wird, wie das z.B. im Falle des Patienten 1996/83 möglich ist, dessen Spermatozoen fast völlig immotil sind. Bei den meisten Patienten tragen aber wohl verschiedene Faktoren dazu bei, daß der betreffende Patient subfertil bzw. infertil ist.

Mit Hilfe der 1981 erstmals von Talbot und Chancon angegebenen "triple-stain"-Technik wurden Ejakulate von 120 Männern, welche die Fertilitätssprechstunde an der Dermatologischen Klinik der Universität München aufsuchten, untersucht.

Bei einem Teil der untersuchten Patienten wurden neben dem akrosomalen Zustand auch Motilitätsparameter mit der fotomikrographischen Dunkelfeldmethode (modifiziert nach Overstreet et. al., 1979) bestimmt.

Darüber hinaus wurden auch die üblichen Befunde des Routine-Spermiogramms erhoben.

Die Untersuchungen wurden zunächst bei 89 Patienten an nativen, d.h. ungewaschenen Ejakulaten kurz nach der Ejakulation (30 Minuten) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß sich die einzelnen Diagnosegruppen (Normo-, Astheno-, Oligo- und Teratozoospermie) bezüglich des akrosomalen Zustandes nicht unterschiedlich verhalten. Ferner ergab sich, daß die Zahl der akrosomenlosen Spermatozoen ein statistisch asymmetrisch verteiltes Merkmal ist.

Anschließend wurde bei weiteren 31 Patienten der Verlauf der Akrosomreaktion über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht. Zusätzlich wurden bei 24 dieser Patienten die Motilitätsparameter mit der fotomikrographischen Dunkelfeldmethode bestimmt.

Für die normo-, astheno-, oligo- und teratozoospermen Patienten ergab sich im "triple-staining" kein unterschiedliches Verhalten. Einzelne Patienten aus diesen Diagnosegruppen weichen jedoch recht stark von den Mittelwerten ab.

Eine eigens für diese Untersuchungen einbestellte Gruppe von Polyzoospermiepatienten ( $n = 7$ ) zeigte eine fehlende oder deutlich schwächer ausgeprägte Akrosomreaktion als die Patienten der anderen Diagnosegruppen. Bei den meisten der polyzoospermen Patienten blieb ein Anstieg der Zahl akrosomal

reagerter Samenzellen über die Inkubationsdauer aus.

Bei den Ejakulaten, bei welchen Motilitätsmessungen vorgenommen wurden, wurde die Zahl der motilen Samenzellen in % aller Spermatozoen, die Zahl der hyperaktivierten in % der motilen Spermatozoen und die durchschnittliche Spermatozoengeschwindigkeit angegeben. Darüber hinaus wurden für die einzelnen Diagnosegruppen die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Parameter berechnet.

Die Motilitätsparameter waren bei der Gruppe der Asthenozoospermiepatienten erwartungsgemäß am schwächsten ausgeprägt. Zusammenfassend kann daher gesagt werden, daß das "triple-staining" insbesondere bei polyzoospermen Patienten neben den Befunden des andrologischen Routinelabors einen weiteren sinnvollen Parameter darstellt. Bei einzelnen Fällen aus den anderen andrologischen Diagnosegruppen mag es möglich sein mit Hilfe des "triple-stainings" die Ursachen der Infertilität zu erhellen. Hierzu sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams, C.E. and Chang, M.C. (1962)  
Capacitation of rabbit spermatozoa in the fallopian tubes and in the uterus.  
J. Exp. zool. 151: 159-166
2. Ahluwails, B. and Holman, R.T. (1969)  
Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen.  
J. Reprod. Fertil. 18: 431-437
3. Aitken, R.J. (1983)  
Clinical assessment of human sperm function.  
J. Obst. Gyn. (Suppl 2) 3: 48-52
4. Aitken, R.J. (1985)  
Diagnostic value of the zona-free hamster oocyte penetration test and sperm movement characteristics in oligozoospermia.  
I. J. Androl. 8: 348-356
- 4a. Aitken, R.J., Wang, V.F., Liu, J., Best, F., Richardson, D.W.  
The Influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test.  
Int. J. Androl., 6, 180-193
5. Allison, A.C. and Hartree, E.F. (1970)  
Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilisation.  
J Reprod. Fertil. 21: 501-515
6. Anouma, S., Mayumi, T., Suzuki, K., Noguchi, T., Iwai, M., Okabe, M. (1973)

Studies on sperm capacitation. I. The relationship between a guinea pig sperm coating antigen and a sperm capacitating phenomenon.  
J. Reprod. Fertil. 35: 425-432

7. Austin, C.R. (1951)  
Observations on the penetration of sperm into the mamalian egg.  
Aust. J. Sci. Res. B4: 581-589
8. Austin, C.R. (1952)  
The "capacitation" of the mamalian sperm.  
Nature 170: 326
9. Austin, C.R. (1974)  
Principles of fertilisation.  
Proc. Roy. Soc. Med. 67: 925-927
10. Austin, C.R. (1975)  
Membrane fusion events in fertilisation.  
J. Reprod. Fertil. 44: 155-166
11. Austin, C.R. and Bishop, M.W.H. (1958)  
Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilisation.  
Proc. Roy. Soc. Br. 149: 241-248
12. Baccetti, B., Pallini, V., Burrini, A.G. (1973)  
Accessory fibers of the sperm tail. I. Structure and chemical composition of the bull "coarse fibers".  
J. Submicr. Cytol. 5: 237-256
13. Barfield, A., Melo, J., Coutinho, E., Alvarez, F., Faundes, A., Brache, V., Leon, P., Frick, J., Bartsch, G., Weiske, W.H. (1979)  
Pregnancies associated with sperm concentrations below 10 million/ml in clinical studies of a potential male contraceptive method, monthly depot med-roxiprogesterone acetate and testosterone esters.

Contraception 20: 121-127

14. Barnea, E.R., Arronet, G.H., Weissenberg, R., Lunenfeld, B. (1980)  
Studies on polyzoospermia.  
Int. J. Fertil. 25: 303-306
15. Barros, C. and Franklin, L. (1968)  
Behavior of the gamete membranes during sperm entry into the mammalian egg.  
J. Cell Biol. 37: C 13
16. Bedford, J.M. (1969)  
Morphological aspects of sperm capacitation in mammals.  
Adv. Biosci. 4: 35-50
17. Bedford, J.M. (1970)  
Sperm capacitation and fertilisation in mammals.  
Biol. Reprod. (Suppl.) 2: 128-158
18. Bedford, J.M. (1971)  
An electron microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating.  
Amer. J. Anat. 133: 213
19. Bedford, J.M. (1983)  
Significance of the need of sperm capacitation before fertilisation in eutherian mammals.  
Biol. Reprod. 28: 108-120
20. Bedford, J.M. and Cooper, G.W. (1978)  
Membrane fusion events in the fertilisation of vertebrate eggs.  
In: Poste, G., Nicolson, G.L. (Hrsg.): "Membrane Fusion". Cell surface Reviews, Vol. 5. Amsterdam: Elsevier-North-Holland Biomed. Press: pp 65-125

21. Bedford, J.M., Moore, H.D.M., Franklin, L.E. (1979)  
Significance of the equatorial segment of the  
acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals.  
Exp. Cell Res. 119: 119-126
  
22. Beier, H.M. (1974)  
Oviductal and uterine fluids.  
J. Reprod. Fertil. 37: 221-237
  
23. Bleau, G., Bodley, F.H., Longpre J., Chapdelaine,  
A., Roberts, K.D. (1974)  
Cholesterol sulfate. I. Occurrence and possible  
function as an amphipatic lipid in the membrane of  
the human erythrocyte.  
Biochim. Biophys. Acta 352: 1-9
  
24. Bleau, G., Lalumiere, G., Chapdelaine, A., Roberts,  
K.D. (1975)  
Red cell surface structure stabilisation by  
cholesterol sulfate as evidenced by scanning  
electron microscopy.  
Biochim. Biophys. Acta 375: 220-223
  
25. Bouthillier, M., Bleau, G., Chapdelaine A., Roberts,  
K.D. (1981)  
Sterol sulfotransferase activity in hamster  
epididymis.  
Steroids 38: 532-535
  
26. Burck, P.J. and Zimmerman, R.E. (1980)  
The inhibition of acrosin by sterol sulfates.  
J. Reprod. Fertil. 58: 121-125
  
27. Burkman, L.J. (1984)  
Characterisation of hyperactivated motility by human  
spermatozoa during capacitation: Comparison of  
fertile and oligozoospermic sperm populations.  
Arch. Androl. 13: 153-165

28. Byrd, W. and Wolf, D.P. (1986)  
Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm.  
Biol. Reprod. 34: 854-869
29. Calvin, H.I. and Bedford, J.M. (1971)  
Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis.  
J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 13: 65-75
30. Chang, M.C. (1951)  
Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube.  
Nature 168: 697-698
31. Chang, M.C. (1957)  
A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing ability of sperm.  
Nature 179: 258-259
32. Chang, M.C. (1984)  
The meaning of sperm capacitation. A historical perspective.  
J. Androl. 5: 45-50
33. Conway, A.F. and Metz, C.B. (1971)  
A possible role of phospholipase in membrane fusion.  
In: Proc. of the 11th Annual Meeting of the Society of Cell Biologists: p 64
34. Croce, C.M., Sawicki, W., Kritchevski, D., Koprowski, H. (1971)  
Induction of homocaryocyte, heterocaryocyte and hybrid formation by lysolecithin.  
Exp. Cell Res. 67: 427-435

35. Cummings, J.M. (1982)  
Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from oviducts of mated Ewes.  
Gamete Res. 6: 53-63
36. Cummings, J.M. and Yanagimachi, R. (1982)  
Sperm-egg ratios and the site of acrosome reaction during in vivo fertilisation in the hamster.  
Gamete Res. 5: 239-256
37. Dan, J.C. (1952)  
Studies on the acrosome I. Reactions to egg-water and other stimuli.  
Biol. Bull. 103: 54-56
38. Dan, J.C. (1954)  
Studies on the acrosome. II. Acrosome reaction in starfish spermatozoa.  
Biol. Bull. 107: 203-218
39. Darin-Bennet, A. and White, I.G. (1973)  
Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock.  
Cryobiology 14: 466-470
40. Davis, B.K. (1974)  
Decapacitation and recapacitation of rabbit spermatozoa treated with membrane vesicles from seminal plasma.  
J. Reprod. Fertil. 41: 241-244
41. Davis, B.K. (1978)  
Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles.  
In: ACCS Monograph No. 5: "Symposium on the Pharmacological Effects of Lipids": pp 145-158

42. Davis, B.K. (1980)  
Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilisation action of cholesterol.  
Arch. Androl. 5: 249-254
43. Davis, B.K. and Niwa, K. (1974)  
Inhibition of mammalian fertilisation in vitro by membrane vesicles from seminal plasma.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146: 11-16
44. Davis, B.K. and Hungund, B.J. (1976)  
Effect of modified membrane vesicles from seminal plasma on the the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa.  
Biochim. Biophys. Res. Comm. 69: 1004-1010
45. Davis, B.K., Byrne, R., Hungund, B. (1979)  
Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro.  
Biochim. Biophys. Acta 558: 257-266
46. Davis, B.K., Byrne, R., Hungund, B. (1979)  
Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro.  
Biochim. Biophys. Acta 558: 257-266
47. Davis, B.K. and Byrne, R. (1980)  
Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. II. Evidence of a membrane thermotropic transition.  
Arch. Androl. 5: 255-261

48. Davis, B.K., Byrne, R., Bedigian, K. (1980)  
Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1564-1550
49. Doak, R.L., Hall, A., Dale, H.E. (1967)  
Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch.  
J. Reprod. Fertil. 13: 51-58
50. Dott, H.M. and Dingle, J.T. (1968)  
Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmatic droplets of bull and ram.  
Expl. Cell Res. 52: 523
51. Dudenhausen, E. and Talbot, P. (1982)  
Detection and kinetics of the normal acrosome reaction of mouse sperm.  
Gamete Res. 6: 257-265
52. Eng, A.L., und Oliphant, G. (1978)  
Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilisation with highly purified glycoprotein from seminal plasma.  
Biol. Reprod. 19: 1083-1094
53. Fawcett, D.W. (1970)  
A comparative view of sperm ultrastructure.  
Biol. Reprod. (Suppl.) 2: 90-127
54. Fawcett, D.W. (1975)  
The mamalian spermatozoon.  
Dev. Biol. 44: 394-436
55. Fawcett, D.W. and Ito, S. (1965)  
The fine structure of bat spermatozoa.  
Amer. J. Anat. 116: 567-610

56. Fleming, A.D. and Yanagimachi, R. (1981)  
Effects of various lipids on the acrosome reaction  
and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa  
with special reference to possible involvement of  
lysophospholipids in the acrosome reaction.  
Gamete Res. 4: 253-273
57. Fleming, A.D. and Yanagimachi, R. (1982)  
Fertile life of acrosome-reacted guinea pig  
spermatozoa.  
J. Exp. Zool. 220: 109-116
58. Fleming, A.D. and Yanagimachi, R. (1984)  
Evidence suggesting the importance of fatty acids  
and the fatty acid moieties of sperm membrane  
phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig  
spermatozoa.  
J. Exp. Zool. 229: 485-489
59. Fraser, L.R. (1977)  
Motility patterns in mouse spermatozoa before and  
after capacitation.  
J. Exp. Zool. 202: 439-444
60. Fraser, L.R. (1981)  
Dibutyrylcyclic AMP decreases capacitation time in  
vitro in mouse spermatozoa.  
J. Reprod. Fertil. 62: 63-72
61. Fraser, L.R. (1982)  
 $\text{Ca}^{2+}$  is required for mouse sperm capacitation and  
fertilization in vitro.  
J. Androl. 3: 412-419

62. Gabara, B., Gledhill, B.L., Croce, C.M., Cesarini, J.P., Koprowski, H. (1973)  
Ultrastructure of rabbit spermatozoa after treatment with lysolecithin and in the presence of hamster somatic cells.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143: 1120-1124
63. Gledhill, B.L., Sawicki, W., Croce, C.M., Koprowski, H. (1972)  
DNA synthesis in rabbit spermatozoa after treatment with lysolecithin and fusion with somatic cells.  
Exp. Cell Res. 73: 33-40
64. Glezerman, M., Bernstein, D., Zakut, C., Misgav, N., Insler, V. (1982)  
Polyzoospermia: a definite pathologic entity.  
Fertil. Steril. 38: 605-608
65. Glomset, J.A. (1968)  
The plasma lecithin : cholesterol acyltransferase reaction.  
J. Lipid. Res. 9: 155-167
66. Gwatkin, R.B.L. and Anderson, C.F. (1969)  
Capacitation of hamster spermatozoa by bovine follicular fluid.  
Nature 224: 1111-1112
67. Hafez, E.S.E. (1973)  
Transport of spermatozoa in the female reproductive tract.  
Amer. J. Obstet. Gynec. 115: 703
68. Hammer, C.E., Williams, W.L. (1963)  
Effect of the female reproductive tract on sperm metabolism in the rabbit and fowl.  
J. Reprod. Fertil. 5: 143-150

69. Hunter, A.G. and Nornes, H.O. (1969)  
Characterisation and isolation of a sperm-coating antigen from rabbit seminal plasma with the capacity to block fertilisation.  
J. Reprod. Fertil. 20: 419-427
70. Jain, M.K. and de Haas, G.H. (1983)  
Activation of phospholipase A<sub>2</sub> by freshly added lysophospholipids.  
Biochim. Biophys. Acta 736: 157-162
71. Johnson, L.L., Katz, D.F., Overstreet, J.W. (1981)  
The movement characteristics of rabbit spermatozoa before and after activation.  
Gamete Res. 4: 275-282
72. Jones, R.C. (1973)  
Changes occurring in the head of boar spermatozoa: Vesiculation or vacuolation of the acrosome?  
J. Reprod. Fertil. 33: 113-118
73. Karlson, P. (1977)  
Phospholipide, Glycolipide und Membranen (13. Kapitel). Aus: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler (10. Aufl.).  
Stuttgart, G. Thieme Verlag SS 211-222
74. Katz, D.F., Yanagimachi, R., Dresdner, R.D. (1978)  
Movement characteristics and power output of guinea pig and hamster spermatozoa in relation to activation.  
J. Reprod. Fertil. 52: 167-172
75. Katz, D.F. and Yanagimachi, R. (1980)  
Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct.  
Biol. Reprod. 22: 759-764

76. Katz, D.F., Overstreet, J.W., Pelfrey, R.J. (1981)  
Integrated assessment of the motility, morphology  
and morphometry of human spermatozoa.  
Inserm. 103: 97-100
77. Kunze, H., Nahas, N., Wurl, M. (1974)  
Phospholipases in human seminal plasma.  
Biochim. Biophys. Acta 348: 35-44
78. Lalumiere, G., Bleau, G., Chapdelaine, A., Roberts,  
K.D. (1976)  
Cholesteryl sulfate and sterol sulfatase in the  
human reproductive tract.  
Steroids 27: 247-260
79. Lambert, H. (1981)  
Temperature dependence of capacitation in bat sperm  
monitored by zona-free hamster ova.  
Gamet Res. 4: 525-533
80. Langlais, J., Zollinger, M., Plante, L., Chapdelaine  
A., Bleau, G., Roberts, K.D. (1981)  
Localization of cholesteryl sulfate in human sperma-  
tozoa in support of a hypothesis for the mechanism  
of capacitation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7266-7270
81. Langlais, J., Plante, L., Bleau, G., Chapdelaine,  
A., Roberts, K.D. (1982)  
Metabolism of lysophosphatidylcholine in relation to  
sperm capacitation.  
Fertil. Steril. 38: 135-136
82. Langlais, J. and Roberts, K.D. (1985)  
A molecular membrane model of sperm capacitation and  
the acrosome reaction of mammalian spermatozoa.  
Gamete Res. 12. 183-224

83. Lighthill, J. (1976)  
Flagellar hydrodynamics.  
SIAM Rev. 18: 161-162
84. Lui, C.W. and Meizel, S. (1977)  
Biochemical studies of the in vitro acrosome reaction inducing ability of bovine serum albumin.  
Differentiation 9: 59-66
85. Lui, C.W. and Meizel, S. (1979)  
Further evidence in support of a role for hamster sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction.  
J. Exp. Zool. 207: 173-186
86. Makler, A. (1978)  
A new chamber for rapid sperm count and motility estimation.  
Fertil. Steril. 30: 313-318
87. Malett, P.J., Stock, C.E., Fraser, L.R. (1985)  
Acrosome loss in human sperm incubated in vitro under capacitating conditions.  
Int. J. Androl. 8: 357-364
88. Mayes, P.A. (1979)  
Metabolism of lipids: I. Fatty acids (Chap. 22). In: Harper, H.A., Rodwell, V.W., Mayes, P.A. (eds.): Review of physiological chemistry (17th ed.), Los Altos, Ca. Lange Medical Publications: pp 321-342
89. Meizel, S. and Turner, K.O. (1983)  
Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids.  
FEBS Lett 161: 315-318

90. Meyhöfer, W. (1963)  
Mikrospektrophotometrische Messungen des Nukleinsäuregehaltes von Spermatozoen fertiler und infertiler Männer.  
Arch. klin. exp. Dermat. 216: 556-614
91. Minissian, E.S. and Turner, C. (1966)  
Biosynthesis of lipids by human and fish spermatozoa.  
Am. J. Physiol. 210: 615-618
92. Mounib, M.S. and Chang, M.C. (1964)  
Effect of in utero incubation on the metabolism of rabbit spermatozoa.  
Nature 201: 943-944
93. Nagae, T., Yanagimachi, R., Srivastava, P.N., Yanagimachi, H. (1986)  
Acrosome reaction in human spermatozoa.  
Fert. Ster. 45: 701-708
94. Nissen, H.P. and Kreysel, H.W. (1983)  
Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility.  
Andrologia 15 (3): 246-269
95. Ohuzu, E. and Yanagimachi, R. (1982)  
Acceleration of the acrosome reaction in hamster by lysolecithin.  
J. Exp. zool. 224: 259-263
96. Osser, S., Gennser, P., Liedholm, P., Ranstam, J. (1983)  
Variation of semen parameters in fertile men.  
Arch. Androl. 10: 127-133

97. Overstreet, J.M., Katz, D.F., Hanson, F.W., Fonseca, J.R. (1979)  
A simple inexpensive method for objektive assessment of human sperm movement characteristics.  
Fertil. Steril. 31: 162-172
98. Page, E., Villee, C.A., Villee, D.B. (1972)  
Human reproduction.  
Philadelphia, W.B. Saunders Co.: 125-128
99. Pico, L. and Tyler, A. (1964)  
Fine structural studies of sperm penetration in the rat.  
Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. Trento 2: 372-377
100. Plachot, M., Mandelbaum, J., Junca, A.-M. (1984)  
Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization.  
Fertil. Steril. 42: 418-423
101. Price, J.M. (1973)  
Biochemical and morphological studies of outer dense fibers of rat spermatozoa.  
J. Cell Biol. 59: 272a
102. Quarford, S.H. and Hilderman, H.L. (1970)  
Quantitation of the in vitro free cholesterol exchange of human red cells and lipoproteins.  
J. Lipid. Res. 11: 528-535
103. Rand, R.P., Pangborn, W.A., Purdon, A.D., Tinker, D.O. (1975)  
Lysolecithin and cholesterol interact stoichiometrically forming bimolecular lamellar structures in the presence of excess water, or lysolecithin or cholesterol.  
Can. J. Biochem. 53: 189-195

104. Reyes, A., Oliphant, G., Brackett, B.G. (1975)  
Partial purification and identification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma.  
Fertil. Steril. 26: 148-157
105. Reyes, A., Martinez, R., Luna, M., Chavarria, M.E., Merino, G. (1984)  
Quantitative evaluation of the human spermatozoal motility and acrosome reaction in in fertile oligozoospermic and fertile euspermic men.  
Arch. Androl. 12: 187-194
106. Robinson, N. and Saunders, L. (1958)  
The physical properties of lysolecithin and its sols.  
J. Pharm. Pharmacol. 10: 755-761
107. Rodriguez-Rigau, L.J. (1981)  
Disturbances of spermatogenesis, pathophysiology and diagnosis. In: Research on Fertility and Sterility. Cortés-Prieto, J., Campos da Paz, A., Neves, E., Castro, M. (Eds.).  
University Park Press, Baltimore, pp 103-114
108. Schaefer, E.J., Foster, D.M., Zech, L.A., Lindgren, F.T., Brewer, H.B., Levy, R.I. (1983)  
The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 57: 262-267
109. Schill, W.-B. (1974)  
Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa.  
Fertil. Steril. 25: 703-712
110. Schill, W.-B. und Feifel, (1984)  
Low acrosin activity in polyzoospermia.  
Andrologia 16: 589-591

111. Schill, W.-B., Töpfer-Petersen, E., Flörke-Gerloff, S., Völcker, C., Engel, W., Tschesche, H., Müller-Esterl, Schmidt, G.J. (1984)  
Nachweis eines funktionell defekten Akrosoms als Ursache der Infertilität bei Polyzoospermie.  
Tagung der Arbeitsgemeinschaft dermatologischer Forschung Lübeck 23.-25.11.1984 (Abstr.)
112. Schill, W.-B., Töpfer-Petersen, E., Flörke-Gerloff, S., Schmidt, G.J., Völcker, C., Engel, W., Feifel, M. (1985)  
Polyzoospermia: evidence for a functional defect acrosome.  
IIIrd International Congress of Andrology, Boston 27.4.-2.5.1985
113. Schirren, C. (1982)  
Praktische Andrologie  
Schering AG  
2. Auflage
114. Shalgi, R., Kraicer, P., Rimon, A., Pinto, M., Soferman, N., (1973)  
Proteins of human follicular fluid: The blood follicle barrier.  
Fertil. Steril. 24: 429-434
115. Simpson, E.R., Rochelle, D.B., Carr, B.R., Mac Donald, P.C. (1980)  
Plasma lipoproteins in follicular fluid of human ovaries.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 51: 1469-1471
116. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972)  
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.  
Science 175: 720-731

117. Singer, L.S., Lambert, H., Cross, N.L., Overstreet, J.W. (1985)  
Alteration of the human sperm surface during in vitro capacitation as assessed by lecithin-induced agglutination.  
Gamete Res. 12: 291-299
118. Smith, K.D., Rodriguez-Rigau, L.J., Steinberger, E. (1977)  
Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples.  
Fertil. Steril. 28: 1314
119. Srivastava, P.N. and Gould, K.G. (1973)  
Inhibition of the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa by sialoproteins.  
Contraception 7: 65-73
120. Stefanini, M., Oura, C., Zambone, L. (1969)  
Ultrastructure of fertilisation in the mouse. 2. Penetration of sperm into the ovum.  
J. Submicro. Cytol. 1: 1-23
121. Stein, O., Stein, Y. (1973)  
The removal of cholesterol from Landschutz ascites cells by high-density apolipoprotein.  
Biochem. Biophys. Acta 326: 232-244
122. Suarez, S.S., Katz, D.F., Overstreet, J.W. (1983)  
Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at site and time of fertilisation.  
Biol. Reprod. 29: 1277-1287
123. Talbot, P. and Franklin, L.E. (1976)  
Morphology and kinetics of hamster sperm acrosome reaction.  
J. Exp. Zool. 198: 163-176

124. Talbot, P., Summers, R.G., Hylander, B.L., Keough, E.M., Franklin, L.E. (1976)  
The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187.  
J. Exp. Zool. 198: 383-392
125. Talbot, P. and Chancon, R.S. (1981)  
A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm.  
J. Exp. Zool. 215: 201-208
126. Thakkar, J.K., East, J. Franson, R.C. (1984)  
Modulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity associated with human sperm membranes by divalent cations and calcium antagonists.  
Biol. Reprod. 30: 679-686
127. Töpfer-Petersen, E., Heissler, E., Sato, H., Schill, W.-B. (1984)  
Clinical and experimental investigations of the acrosome and the acrosome reaction in man.  
Monte Carlo
128. Töpfer-Petersen, E., Heissler, E., Schill, W.-B. (1985)  
The kinetics of acrosome reaction - an additional sperm parameter ?  
Andrologia 17: 224-227
129. Töpfer-Petersen, E., Völcker, C., Heissler, E., Schill, W.-B. (1986)  
Absence of acrosome reaction in polyzoospermia.  
Im Druck

130. Triana, W.R., Babcock, D.F., Lorton, S.P., First, N.L., Lardy, H.A. (1980)  
Release of acrosomal hyaluronidase follows increased membrane permeability to calcium in the presumptive capacitation sequence for spermatozoa of the bovine and other mammalian species.  
Biol. Reprod. 23: 47-59
131. Tschesche, H., Wittig, B., Decker, G., Müller-Esterl, W., Fritz, H. (1982)  
A new acrosin inhibitor from boar spermatozoa.  
Eur. J. Biochem. 285: 1-6
132. Vogt, H.-J., Schill, W.-B., Menken, T. (1984)  
Impulszytometrische Untersuchungen bei Polyzospermie.  
In: Fortschritte der Fertilitätsforschung 12.  
(C. Schirren und K. Semm, Hrsg)  
Grosse Verlag, Berlin, S. 130-133
133. Williams, W.L., Abney, T.O., Chernott, H.N., Duklow, W.R., Pinsker, M.C. (1967)  
Biochemistry and physiology of decapacitation factor.  
J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 2: 11-23
134. Yanagimachi, R. (1969)  
In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions.  
J. Exp. Zool. 170: 269-280
135. Yanagimachi, R. (1970)  
The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation.  
J. Reprod. Fertil. 23: 193-196

136. Yanagimachi, R. (1972)  
Fertilisation of guinea pig sperm in vitro. Anat.  
Rec. 174: 9-20
137. Yanagimachi, R. (1981)  
Mechanisms of fertilisation in mammals.  
In: Fertilisation and Embryo Development in vitro.  
(L. Mastroianni and J.D. Biggers, eds.)  
Plenum Publ., New York,
138. Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1970)  
Electron microscope studies of sperm incorporation  
into the golden hamster egg .  
Amer. J. Anat. 128: 429-462
139. Yanagimachi, R. and Usui, N. (1974)  
Calcium dependence of the acrosome reaction and  
activation of guinea pig spermatozoa.  
Exp. Cell Res. 89: 161-174
140. Yanagimachi, R. and Mahi, C. (1976)  
The sperm acrosome reaction and fertilisation in the  
guinea pig: a study in vivo.  
J. Reprod. Fertil. 46: 49-54
141. Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., Rogers, B.J.  
(1976)  
The use of zona-free animal ova on atest system for  
the assessment of fertilizing capacity of human  
spermatozoa.  
Biol. Reprod. 15: 471-476
142. Yanagimachi, R. and Phillips, D.M. (1984)  
The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa  
immediately before fertilisation in vivo.  
Gamete Res. 9: 1-19

143. Zaneveld, L.J.D. and Williams, W.L. (1970)  
A sperm enzyme that disperses the corona radiata and  
its inhibition by decapacitating factor.  
Biol. Reprod. 2: 363-368

Herrn Prof. Dr. med. W.-B. Schill danke ich für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die hilfreichen Ratschläge.

Bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. E. Töpfer-Petersen bedanke ich mich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit und die wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Die praktische Arbeit im Labor wurde mir durch die Kooperationsbereitschaft von Frl. Weiss und Frl. Spitzauer, die mich immer hilfsbereit und aufgeschlossen in meiner Arbeit unterstützten, sehr erleichtert.

Frau Feifel, Frau Koukouwetsos und Frau Kaiser danke ich für die freundliche Hilfe, die sie mir zukommen ließen.

Am 7. März 1960 wurde ich als Sohn von Karl Heißler (28. 07. 1922 - 23. 02. 1982) und seiner Frau Elisabeth Heißler (22. 11. 1923 - 28. 06. 1970), geb. Freiin von Preuschen von und zu Liebenstein, in Nürnberg geboren.

Von September 1966 bis Juli 1970 besuchte ich die Grundschule in Nürnberg.

Im September 1970 wechselte ich an das Neue Gymnasium (humanistischer Zweig) in Nürnberg. Dort erwarb ich am 27. Juni 1979 die allgemeine Hochschulreife.

Im Februar 1971 heiratete mein Vater Waltraud Bergmann.

Von November 1979 bis April 1986 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität Humanmedizin. Am 13. Juni 1986 wurde ich als Arzt approbiert.







